

УДК 576:858

С.О. Соловійов, О.П. Трохименко,
О.В. Обертинська, Л.Г. Жолнер

АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *IN VITRO* РОТАВІРУСІВ ЛЮДИНИ G1- ТА G2-ГЕНОТИПІВ, ВИДІЛЕНИХ НА ТЕРИТО- РІЇ УКРАЇНИ

Вступ

За даними ВООЗ, щорічно понад 2 млн дітей у всьому світі госпіталізується з діагнозом “гостра ротавірусна діарея”, 527 тис. з яких помирає. Понад 85 % таких випадків припадає на країни Африки і Азії, що пов’язано з неналежним медичним обслуговуванням та недостатнім білковим харчуванням [1].

В Україні ротавірусна інфекція (РВІ) статистично почала реєструватись тільки на початку 90-х років минулого століття. Тоді показники захворюваності в окремі роки коливались від 0,94 до 3,18 % на 100 тис. населення. Впродовж останніх років в Україні було зареєстровано сезонні спалахи РВІ в Одесі, Одеській області (2001–2002 рр.) та в Києві (2005–2008 рр.). Для запобігання виникненню спалахів РВІ і її поширенню поряд із застосуванням санітарно-гігієнічних та протиепідемічних заходів найбільш дієвою вважається специфічна профілактика [2, 3].

Дві вакцини проти ротавірусного гастроентериту було впроваджено до застосування Європейською медичною агенцією в 2006 р.: RotaRix і RotaTeq. Вакцина RotaRix – це жива культуральна вакцина на основі штамів ротавірусів G1P [8] людини, атенуйованих у перещеплювальній культурі клітин нирки мавпи Vero. RotaTeq – жива реасортантна ротавірусна вакцина на основі ротавірусів людей і телят, яка містить у собі п’ять серотипів ротавірусів: G1P [5], G2P [5], G3P [5], G4P [5], G6P [8, 4], аналогів яких не виявлено в природі [4, 5].

За умов перспективи застосування в Україні живої вакцини для специфічної профілактики ротавірусної інфекції у дітей раннього віку для прогнозування ефективності та наслідків її впровадження надзвичайно актуальним є виділення з клінічного матеріалу і вивчення біологічних властивостей ротавірусів, поширених серед людей на території України, зокрема їх молекулярно-генетичних характеристик, здат-

ності до репродукції в живих системах, можливості культивування в культурі клітин, умов інактивації, чутливості до сучасних дезінфектантів та спорідненості до сорбційних препаратів. Важливими як для медицини, так і для біотехнології є створення Національної колекції актуальних для України штамів ротавірусів і відбір перспективних штамів для конструювання протиротавірусних вакцин і діагностичних тест-систем. Однією з найважливіших біологічних властивостей ротавірусів людини є їх здатність адаптуватись до умов культивування в культурі клітин.

Постановка задачі

Метою даного дослідження є виділення ротавірусів, поширених на території України, з клінічного матеріалу від людей, хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ), та визначення їх генотипів і адаптація до умов культивування *in vitro*.

Матеріали і методи

Для дослідження було взято такі матеріали.

Віруси. Ротавірус групи А мавп штам SA-11 і ротавірус людини HRV-134 з колекції штамів кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика.

Культури клітин. Перещеплювальна культура клітин карциноми гортані людини HEP-2 з банку клітинних культур ІЄПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України та перещеплювальна культура клітин із тестикулярної тканини поросят ПТП, отримана з банку клітинних культур Інституту ветеринарної медицини УААН.

Клінічний матеріал. 247 проб фекалій від дітей з ГКІ, відібраних у зимово-весняний період 2007–2009 рр. у Чернігівській та Львівській областях.

Живильні середовища. Ростове середовище для культивування культур клітин на основі середовищ MEM і 199 (Sigma, USA) в однакових співвідношеннях із додаванням сироватки ембріонів корів до 5,0 % (Perbio, Belgium) та антибіотиків 100 од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину (Україна) та підтримуюче середовище – на основі середовищ MEM і 199 без сироватки з додаванням антибіотиків.

Допоміжні реактиви. Розчин протеолітичного ферменту трипсину 0,25 % для культур клітин (БіотестМед – Україна) та інгібітор протеаз аprotинін (контрикал (AWD.pharma GmbH & Co KG – Великобританія).

Виявлення антигенів ротавірусів групи А в клінічних пробах проводилось за допомогою

швидких імунохроматографічних тестів (СІТО TEST ROTA/ADENO, Фармаско, Іспанія).

Генотипування ротавірусів у позитивних пробах проводилось методом ланцюгової полімеразної реакції із зворотною транскрипцією. Генотипна ротавірусна РНК виділялась із попередньо підготовлених проб фекалій за допомогою комерційного набору "РибоСорб" ("АмпліСенс–Rotavirus-290", Росія) згідно з інструкцією виробника. Реакція зворотної транскрипції проводилась відразу після виділення РНК у зв'язку з її лабільністю в очищеній формі. Комплементарна вірусній геномній РНК кДНК одержувалась з використанням набору "Реверта-R-100" ("АмпліСенс", Росія) в ампліфікаторі MyCycler (BioRad, USA). Ампліфікація вірусної кДНК виконувалась за звичайною методикою. Генотипування ротавірусів групи А G1, G2, G3, G4-генотипів проводилось методом мультиплексної ПЛР з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією з використанням набору реактивів "АмпліСенс".

Мікроскопічні дослідження. Живі (нефарбовані) інтактні та інфіковані ротавірусами клітинні моношари досліджувались під інвертованим мікроскопом Axiovert 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

Культивування ротавірусів. Виділення ротавірусів і адаптація до умов культивування *in vitro* проводились згідно з розробленою нами методикою [6].

Результати і обговорення

Було досліджено 107 проб фекалій від дітей, хворих на ГКІ з Чернігова та 140 проб фекалій із Львівської області, відібраних у зимово-весняний період сезонних спалахів РВІ у 2007–2009 рр. Виявлення ротавірусних антигенів у клінічних пробах проводилось простими/швидкими тестами на основі імунохроматографічного аналізу.

Антигени ротавірусів було виявлено в 17 із 107 (15,88 %) проб від дітей, хворих на ГКІ з Чернігова, та в 57 із 140 (40,71 %) проб від дітей, хворих на ГКІ із Львівської області, що дало можливість припустити, що саме ротавіруси групи А спричинили спалах гострого гастроентериту в Львівській області.

Із всіх досліджених проб було відібрано п'ять зразків, в яких за допомогою простих/швидких тестів виявлялись тільки антигени ротавірусів групи А. Було визначено генотип ротавірусів методом ПЛР із зворотною транскрипцією. Результати генотипування подано в таблиці.

Отримані результати вказують на поширеність на території України генотипів G1P [8] і

Таблиця. Генотипи ротавірусів, відібрані для адаптації до умов культивування в культурі клітин

№ п/п	№ в колекції	Місце відбору	Джерело	Генотип
1	44	Чернігів	Новонароджена дитина	G1P[8]
2	101	Чернігів	Дитина до одного року	G2P[4]
3	107	Чернігів	Дитина до одного року	G1P[8]
4	136	Львівська область	Трирічна дитина	G1P[8]
5	137	Львівська область	Дворічна дитина	G1P[8]

G2P [4] ротавірусів, таких, які є життєздатними і найбільш поширеними в Європі [5].

Виділення і адаптація ротавірусів до умов культивування в культурі клітин НЕР-2 полягали в проведенні п'яти послідовних пасажувань зразків ротавірусів. Як позитивний контроль в аналогічних умовах проводились послідовні триразові пасажування еталонних зразків ротавірусів із колекції кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика: ротавірусу мавп штам SA-11 і ротавірусу людини HRV-134. Для кожного штаму при титруванні за цитопатичною дією в культурі клітин НЕР-2 було визначено інфекційні титри у всіх зразках – від нативного матеріалу (нульовий пасаж) до п'ятого пасажу. Титри вірусів визначались через 24, 48 і 72 год від моменту інфікування клітинних культур та розраховувались за методом Кербера [7]. Збільшення інфекційних титрів свіжовиділених штамів ротавірусів при їх адаптації до умов культивування в культурі клітин НЕР-2 залежно від пасажу наведено на рис. 1–5. Було виявлено, що в чотирьох із п'яти виділених штамів ротавірусів (незалежно від генотипу) істотне збільшення інфекційних титрів відбувалось тільки на третьому пасажі (від 1,0 до 4,5 lg ТЦД₅₀/0,1мл) через 24 год після інфікування і досягало максимальних значень 8 lg ТЦД₅₀/0,1мл через 48 і 72 год, що характеризувало динаміку їх репродукції в культурі клітин НЕР-2. Слід зазначити, що за цим показником, після третього пасажу, свіжовиділені штами не відрізнялись від еталонних штамів ротавірусів SA-11 і HRV-134 (рис. 6), що може служити маркером їх адаптації до умов культивування в культурі клітин.

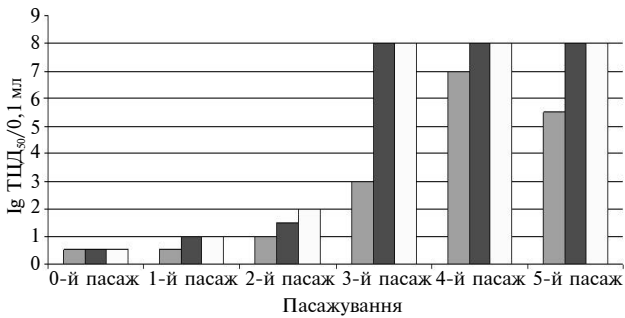


Рис. 1. Динаміка зміни інфекційного титру штаму № 44 (Чернігів): ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

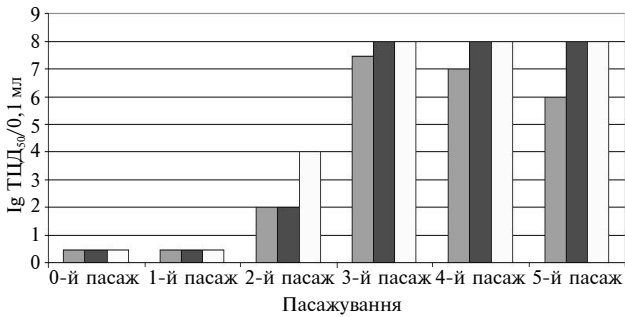


Рис. 2. Динаміка зміни інфекційного титру штаму № 101 (Чернігів): ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

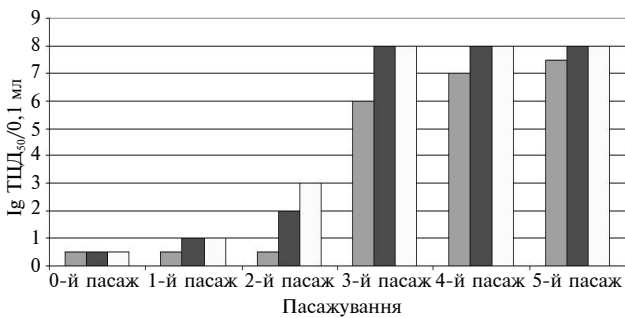


Рис. 3. Динаміка зміни інфекційного титру штаму № 107 (Чернігів): ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

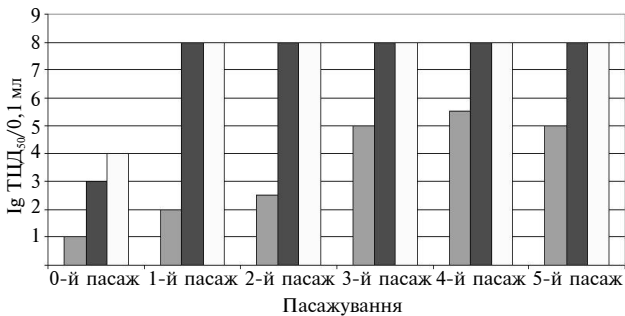


Рис. 4. Динаміка зміни інфекційного титру штаму № 136 (Львівська область): ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

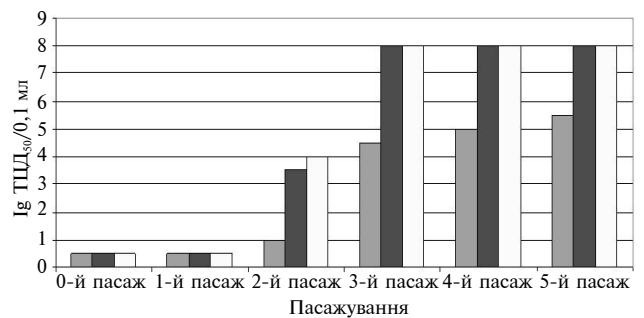


Рис. 5. Динаміка зміни інфекційного титру штаму № 137 (Львівська область): ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

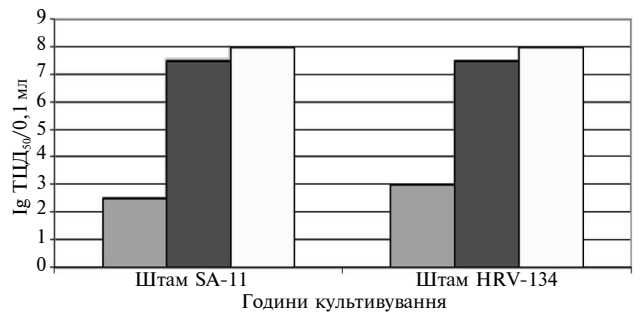


Рис. 6. Динаміка зміни інфекційних титрів штамів SA-11 та HRV-134: ■ – 24 год; ■ – 48 год; □ – 72 год

Серед штамів ротавірусів було виявлено штам № 136 (Львівська область) з генотипом G1P [8], який відрізнявся від інших штамів аналогічного генотипу за здатністю адаптуватись до культивування в культурі клітин. Істотне збільшення інфекційного титру спостерігалось на першому пасажі і досягало максимальних значень ($8 \text{ Ig ТЦД}_{50}/0,1 \text{ мл}$) через 48 і 72 год від моменту інфікування клітинних моношарів, що свідчить про надзвичайно високу здатність адаптуватись до умов культивування в культурі клітин НЕР-2 у цього штаму ротавірусу № 136. Унікальні властивості виділеного штаму вказують на необхідність подальшого вивчення його біологічних властивостей та депонування в колекції штамів, патогенних для людини і тварин як перспективного штаму-кандидата для створення протиротавірусної вакцини, ефективною серед населення України, а також для розробки діагностичних тест-систем. В той же час, було показано, що ці ротавіруси не виявляли цитопатичної дії при культивуванні в культурі клітин ПТП.

Слід зазначити, що ротавіруси людини досі залишаються такими, що дуже важко адаптуються і культивуються в культурі клітин (хоч деякі штами все ж таки було виділено і успішно адаптовано до умов культивування *in vitro*).

Вперше ротавіруси людини, виділені з клінічного матеріалу, вдалось адаптувати до культивування *in vitro* тільки після попереднього одиннадцятиразового пасажування на поросят-гнотобіотах [8]. Цей ротавірус, відомий як Wa, сьогодні успішно культивується як у первинно-трипсинізованих, так і в перешеплювальних клітинних культурах і використовується як один із відомих штамів при конструюванні реасортантних протиротавірусних вакцин. Було показано, що свіжовиділені ротавіруси людини можуть культивуватись у різних культурах клітин без попередньої адаптації на тваринах і що перешеплювальна культура клітин нирки макаки резус MA-104 найбільш чутлива до них [9].

Всі успішні випадки виділення ротавірусів людини в культурі клітин з клінічних проб фекалій були пов'язані з їх попередньою протеолітичною активацією та культивуванням у середовищі без сироватки. Механізм протеолітичної активації ротавірусів полягає в розщепленні білка VP4 протеолітичними ферментами на дві субодиниці VP5 і VP8, які взаємодіють із різними рецепторами на поверхні чутливої клітини. На сьогодні відомо, що рецепторами для ротавірусів людини є видоспецифічні інтегрини $\alpha 2$ - $\beta 1$ і αV - $\beta 3$, конформаційно споріднені з білком VP5 ротавірусів, в той час як рецепторами для ротавірусів тварин є залишки сіалових кислот, конформаційно споріднені з білком VP8 ротавірусів [10].

Виняткову здатність адаптуватись до умов культивування в культурі клітин людини і збільшення інфекційних титрів у виділеного штаму ротавірусу № 136 можна пояснити можливою мутацією в гені, що кодує білок VP4, яка, вірогідно, буде виявлена тільки при секвенуванні

гена, та порівняння отриманих даних з базою даних NCBI.

Нездатність всіх виділених штамів ротавірусів адаптуватись до культури клітин, одержаної з тестикул поросят, може бути зумовлена відсутністю специфічних рецепторів до білків VP5 і VP8 ротавірусу людини на мембрані цих клітин.

Висновки

Виділено з клінічного матеріалу і адаптовано до умов культивування в культурі клітин HEP-2 п'ять штамів ротавірусів людини, які охарактеризовані за генотипами, здатністю до збільшення інфекційних титрів при культивуванні впродовж п'яти пасажів, що можна розглядати як маркер адаптації до культивування *in vitro*. Чотири з п'яти штамів ротавірусів, незалежно від їх генотипів, адаптувались до умов культивування на третьому пасажі в культурі клітин HEP-2. Серед всіх штамів було виділено такий, що мав виняткову здатність адаптуватись до умов культивування в культурі клітин людини HEP-2, при культивуванні якого збільшення інфекційних титрів до $8 \lg$ ТЦД₅₀/0,1 мл спостерігалось уже на перших пасажах, що свідчило про його високу здатність адаптуватись до умов культивування *in vitro*. Цей штам може виявитись перспективним як кандидат для створення вітчизняної протиротавірусної вакцини для специфічної профілактики РВІ, ефективною серед населення України, а також для розробки діагностичних тест-систем. Всі виділені штами були не здатні до культивування в культурі клітин поросят ПТП.

С.А. Соловьев, Е.П. Трохименко, О.В. Обертинская, Л.Г. Жолнер

АДАПТАЦИЯ К УСЛОВИЯМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO* РОТАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА G1- И G2-ГЕНОТИПОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

В культуре клеток человека HEP-2 были выделены и адаптированы к условиям культивирования пять штаммов ротавирусом от детей, больных ОКИ. Штаммы были охарактеризованы по геноти-

S.O. Solovyov, O.P. Trokhimenko, O.V. Obertynska, L.G. Zholner

ADAPTATION TO CULTIVATION CONDITIONS *IN VITRO* AND INCREASE OF INFECTIOUS TITRES OF HUMAN ROTAVIRUSES, ISOLATED ON THE TERRITORY OF UKRAINE

In this paper, we isolate and adapt five strains of rotaviruses for cultivation conditions from children with acute intestinal infections in HEP-2 human cell culture. We characterize the isolated strains accor-

пам и способности к увеличению инфекционных титров при культивировании в течение пяти последовательных пассажей. Выделен штамм, который имеет особую способность адаптироваться к условиям культивирования в культуре клеток человека и может быть перспективным для создания отечественной противоротавирусной вакцины, эффективной среди населения Украины, а также для разработки диагностических тест-систем. Показана неспособность выделенных штаммов культивироваться в культуре клеток поросят ПТП.

ding to genotype and ability to increase the infectious titres during five consecutive passages. Crucially, we isolate the rotavirus strain, which has a special ability to adapt to cultivation conditions in human cell culture. This strain is promising for creating effective rotavirus vaccine for Ukrainians, as well as for developing diagnostic test-systems. Finally, we show the inability of the isolated strains to be cultivated in animal cell culture.

1. *WHO Weekly Epidemiological Record* 2008; **83 (47)**, 27 November 2008.
2. Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Костенко І.Г. Виявлення ротавірусної інфекції у дітей в зимово-весняний період 2006–2007 рр. // *Рациональна фармакотерапія*. – 2008. – № 3/2. – С. 77–80.
3. Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Костенко І.Г. та ін. Ротавірусна інфекція у дітей України // *Профілактична медицина*. – 2009. – № 2. – С. 34–37.
4. Rahman Mustafizur. Molecular epidemiology of human group A rotaviruses. Proefschrift voorgedragen tot het behalen van de graad van Doctor in de Medische Wetenschappen, Leuven, 2008.
5. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations // *Nat Rev Microbiol*. – 2007. – **5(7)**. – P. 529–539.
6. Соловійов С.О., Трохименко О.П., Жолнер Л.Г., Шульга О.А. Особливості виділення ротавірусів людини в культурі клітин та їх адаптація до умов культивування // *Наукові вісті НТУУ “КПІ”*. – 2009. – № 4. – С. 112–117.
7. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І.Я. Коцюмбас, О.Г. Малик, І.П. Патерега та ін.; За ред. І.Я. Коцюмбаса. – Львів: Тріада плюс, 2006. – 360 с.
8. *Cultivable human rotavirus type 2* / United States Patent 4341870.
9. Guerrero C.A., Zárate S., Corkidi G., López S., Arias C.F. Biochemical characterization of rotavirus receptors // MA104 cells. *J. Virol*. – 2000. – **74(20)**. – P. 9362–9371.
10. Ciarlet Max et al. Initial Interaction of Rotavirus Strains with *N*-Acetylneuraminic (Sialic) Acid Residues on the Cell Surface Correlates with VP4 Genotype // *Not Species of Origin J. Virol*. – 2002. – **76**. – P. 4087–4095.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
24 травня 2010 року