

ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 576:858

С.О. Соловійов, О.П. Трохименко,
Л.Г. Жолнер, О.А. Шульга

ОСОБЛИВОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИДІЛЕННЯ РОТАВІРУСІВ ЛЮДИНИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ТА ЇХ АДАПТАЦІЯ ДО УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Вступ

Ротавіруси (РВ) є збудниками гострих кишкових інфекцій (ГКІ) з фекально-оральним механізмом передачі, які уражають дітей переважно раннього віку та молодих тварин різних видів. Ротавірусна інфекція (РВІ) супроводжується лихоманкою, діарейним синдромом, загальною інтоксикацією, зневодненням і у важких випадках закінчується смертю.

Ротавіруси було відкрито в 1973 р. групою австралійських дослідників Р.Ф. Бішоп, Г.П. Девідзон, Ж.Г. Гольмес при електронно-мікроскопічних дослідженнях біопатів дванадцятипалої кишки дітей з клінічними проявами гострого гастроентериту. На електронограмах віруси мали вигляд сферичних частинок діаметром 60–80 нм з чітко окресленим зовнішнім контуром і електроннощільним центром та нагадували коліщата від дитячої машинки, завдяки чому і отримали назву ротавіруси (від лат. *Rota* – колесо) [1, 2]. Нині встановлено, що структура ротавірусів має три білкові оболонки (капсиди), які огортають генóm вірусу, представлений дволанцюговою РНК, що складається з 11 фрагментів. Кожен фрагмент є окремим геном і кодує один із вірусних білків (разом шість структурних (VP) та п'ять неструктурних (NSP) білків). Структурний вірусний білок VP2 формує внутрішній капсид. Білок VP6 утворює середній капсид, є групоспецифічним і зумовлює поділ ротавірусів на сім серогруп (від А до G). Білки зовнішнього капсиду (VP4 і VP7) є типоспецифічними. Саме вони визначають приналежність ротавірусів до певного серотипу в межах серогрупи. Ротавіруси груп А, В і С ідентифіковані в людей, причому саме ротавіруси групи А викликають гострі дегідратуючі діареї в дітей раннього віку. Ротавіруси групи А розрізняються за серотипами, які зумовлюються антигенами зовнішнього вірусного капсиду: VP7 (глікопротеїн, який визначає антигени G-типу) або VP4 (протеазозалежний білок, який визна-

чає антигени Р-типу). Відомо, що в групу А ротавірусів входить 15 G- та 11 Р-серотипів, але в людей ідентифіковані 10 G- та 11 Р-серотипів. П'ять із них, а саме G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] і G9P[8], як зараз відомо, є поширеними серед населення Європи [3].

За даними ВООЗ, в індустріально розвинених країнах світу щорічно реєструється 125 млн випадків РВІ у дітей віком до п'яти років, серед яких 18 млн є тяжкими, що потребують спеціального лікування, 900 тис. закінчуються летально [3].

В Україні РВІ також набула значного поширення. Так, впродовж останніх років були зареєстровані спалахи вірусної інфекції в Одесі та Одеській області (2001–2002 рр.), м. Києві (2005–2007 рр.) серед загальної популяції населення та в родопомічних закладах, спеціалізованих неонатологічних відділеннях [4, 5].

Для запобігання виникненню РВІ та її поширенню найбільш дієвою вважається специфічна профілактика. На сьогодні в Україні вже зареєстровано живу атенуйовану вакцину для специфічної профілактики РВІ [5]. У зв'язку з цим надзвичайної актуальності набуває прогнозування ефективності та наслідків застосування живих вакцин, оскільки вірогідність формування реасортації генів вакцинного і “диких” штамів ротавірусів при їх одночасній циркуляції серед людей створює небезпеку реверсії вірулентності вакцинного штаму ротавірусу або утворення штамів, стійких до фізико-хімічних чинників. Можливе також витіснення ротавірусів певних серотипів із вірусної популяції і заміщення їх іншими, проти яких вакцина не буде ефективною. Відповісти на ці питання неможливо без розробки ефективної технології виділення ротавірусів із клінічного матеріалу від хворих на ГКІ та адаптації їх до умов культивування в культурі клітин.

Постановка задачі

Мета статті полягає в розробці нової технології виділення ротавірусів людини в культурі клітин та їх адаптації до культивування *in vitro*.

Матеріали і методи

Нами були використані такі матеріали: еталонний штам ротавірусу групи А SA-11; штам HRV-134, виділений з людини, хворої на ГКІ; клінічний матеріал, що являв собою 700

проб фекалій від дітей, хворих на ГКІ із семи міст України – Харкова, Одеси, Києва, Чернігова, Львова, Умані та Сум.

Для культивування еталонного та свіжовиділених штамів ротавірусів в умовах *in vitro* використовували перещеплену культуру клітин моноцитарної лейкемії людини L-41 з банку клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології і радіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

У даній статті використовувались:

- ростове середовище для культивування культур клітин на основі RPMI-1640 (Sigma, USA) з додаванням сироватки ембріонів корів до 10 % (Perbio, Belgium) та антибіотиків 100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину;
- підтримувальне середовище на основі RPMI-1640 без сироватки з додаванням антибіотиків.

Індикація ротавірусів у клінічному матеріалі проводилась із застосуванням простих швидких тестів СІТО TEST ROTA (Фармаско) та за допомогою реакції непрямой гемаглютинації (РНГА) з використанням еритроцитарного діагностичного «Ротатест» (НДІ «Темп-2», Росія).

У процесі адаптації та культивування інтактні та інфіковані ротавірусами клітинні моношари досліджувались під інвертованим мікроскопом Axiovert 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

Результати і обговорення

Розробка технології виділення ротавірусів людини з клінічного матеріалу та адаптація ві-

русів до умов культивування в прищепленій культурі клітин відбувалась в чотири етапи.

Перший етап передбачав виявлення маркерів ротавірусної інфекції в кожній пробі клінічного матеріалу за допомогою простих швидких тестів та РНГА. Зважаючи на простоту і швидкість виявлення антигенів ротавірусів групи А в клінічних пробах методом імунохроматографічного аналізу (ІХА), було використано прості швидкі тести СІТО TEST ROTA (Фармаско) на основі цього методу [5]. Для виявлення ротавірусів готували 10 %-ну суспензію зразків фекалій у фосфатно-сольовому буферному розчині при рН 5,4–5,6. З одержаної суспензії тверді частинки видаляли центрифугуванням. В надосаді виявляли антигени ротавірусів методом ІХА згідно з інструкцією до тест-системи. Про наявність ротавірусів у досліджуваному зразку фекалій свідчила поява зеленої лінії в зоні контролю та червоної – в тестовій зоні (рис. 1).

Для подальшого виділення ротавірусів у культурі клітин використовували тільки ті проби, в яких було попередньо виявлено антигени ротавірусів.

На другому етапі підготовляли проби фекалій, в яких було виявлено антигени ротавірусів. Для цього готували 10 %-ні суспензії проб в ізотонічному розчині хлориду натрію. Для кращої екстракції ротавірусів одержані суспензії інтенсивно струшували впродовж 10 хв, центрифугували при 3 тис. об/хв, далі відбирали надосадову рідину і деконтамінували її фільтруванням через міліпорові фільтри з діаметром пор $d = 0,22$ мкм. Одержану суспензію ротавірусу аліквотува-

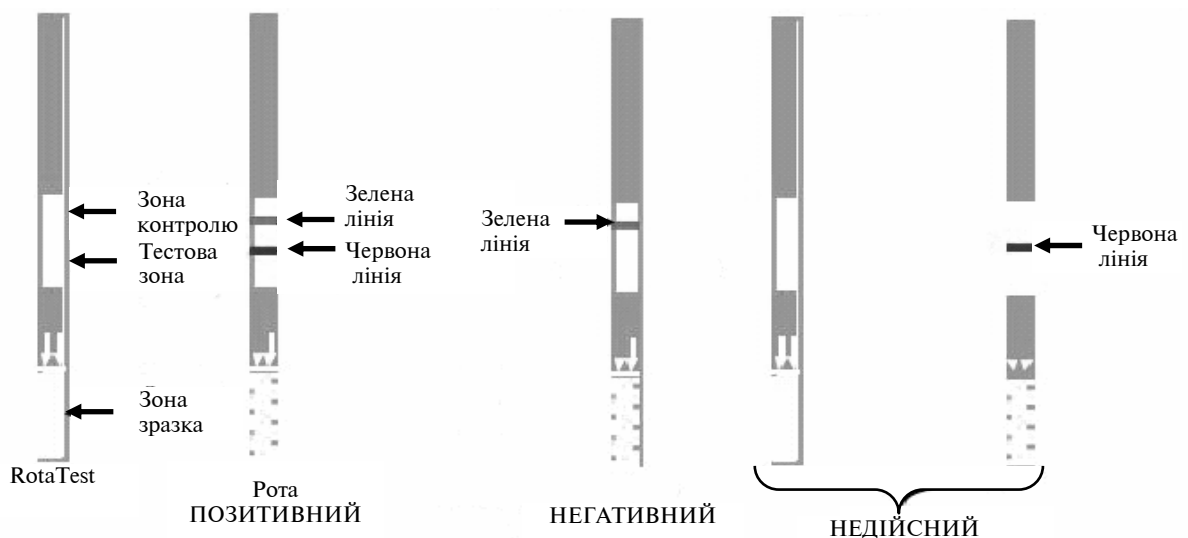


Рис.1. Інтерпретація результатів дослідження зразка фекалій простими швидкими тестами СІТО TEST ROTA (Фармаско)

ли та при потребі зберігали при -40°C .

На третьому етапі виділення ротавірусів у чутливій культурі клітин проводили:

- приготування клітинного моношару;
- промивання клітинного моношару;
- протеолітичну активацію ротавірусів у клінічному матеріалі;
- адсорбцію ротавірусів на поверхні клітин;
- культивування ротавірусів у клітинному моношарі;
- відбір і характеристику ротавірусів за цитопатичною дією (ЦПД) та за допомогою реакції непрямой гемаглютинації (РНГА).

Клітини поверхнево залежної культури клітин моноцитарної лейкемії людини L-41, чутливої до ротавірусів, знімали з поверхні росту 0,02 %-ним розчином Версена і суспендували в ростовому живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням сироватки крові ембріонів корів до 10 % та антибіотиків. При цьому посівна концентрація клітин у суспензії становила $5 \cdot 10^5$ кл/мл. Для культивування клітинної лінії на 24-лунковому полістироловому планшеті вносили по 1 мл суспензії в кожен лунку планшета та культивували при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 впродовж 48 год. Після закінчення культивування контролювали якість одержаних клітинних моношарів під інвертованим мікроскопом. Придатними для культивування вважали тільки ті моношари, де не спостерігалось порушення їх цілості та вогнищ дегенерації клітин.

Після закінчення культивування ростове середовище з лунок планшета видаляли, а клітинні моношари промивали розчином Хенкса або підтримувальним середовищем без сироватки впродовж однієї години при 37°C .

Для запобігання утворенню дефектних вірусних частинок попередньо підготовлену деконтаміновану пробу суспензії ротавірусу розбавляли підтримувальним середовищем у 10 разів.

Зважаючи на те, що ротавіруси людини дуже складно культивуються *in vitro*, їх піддавали протеолітичній активації трипсином у кінцевій концентрації 10–20 мкг/мл впродовж однієї години при 37°C .

Після попереднього видалення розчину з лунок планшета з клітинними моношарами проводили адсорбцію активованих трипсином ротавірусів на відмитих клітинних моношарах впродовж однієї години при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 . Завдяки модифікації поверхневого білка ротавірусу VP4 внаслідок протеолітичної активації підвищувалась ефективність однієї з ранніх ста-

дій репродукції ротавірусу – проникнення вірусної РНК в чутливу клітину [6], яка в даному випадку відбувалась одночасно з адсорбцією.

Після адсорбції проб ротавірусів у лунки планшета додавали підтримувальне середовище до кінцевої концентрації трипсину 1–5 мкг/мл. З метою попередження руйнування клітинного моношару при наявності трипсину в культуральну рідину додавали інгібітор протеаз – аprotинін, досягаючи оптимального співвідношення трипсину та аprotиніну як 1:1 [7].

Ротавіруси культивували при 37°C в атмосфері з 5 % CO_2 впродовж 24–48 год. При цьому періодично контролювали наявність цитопатичної дії (ЦПД) ротавірусів під інвертованим мікроскопом. За умов дотримання вимог описаної технології виявлення ЦПД ротавірусів у зразках, які виділяли з клінічного матеріалу, спостерігалась уже на першому–другому пасажі. Після кожного пасажу культуральну рідину, що містила вірус, заморожували. Це давало можливість інактивувати аprotинін та використовувати трипсин для активації вірусів на наступному пасажі [8].

Четвертий етап полягав в адаптації виділених штамів ротавірусів до умов культивування *in vitro*. При цьому зразки пасажували послідовно три рази з обов'язковим мікроскопічним контролем ЦПД ротавірусів після кожного пасажу та триразово заморожували і розморожували вірусомісну культуральну рідину для підвищення виходу вірусів.

Як позитивний контроль в аналогічних умовах проводили послідовні триразові пасажування еталонних зразків ротавірусів із колекції кафедри вірусології Національної медичної академії післядипломної освіти (НМАПО) ім. П.Л. Шупика: ротавірусу мавп штам SA-11 та ротавірусу людини HRV-134. Прояв цитопатичної дії еталонних і виділених із клінічного матеріалу штамів ротавірусів, який зафіксовано за допомогою мікрофотозйомки, вказує на схожість дії музейних (еталонних) та виділених штамів ротавірусів (рис. 2).

За наявності прояву ЦПД свіжовиділених та еталонних штамів ротавірусів у культурі клітин їх антигенний титр у культуральній рідині було визначено в РНГА із специфічним еритроцитарним діагностикомом "Ротатест" і становив 1:128–1:256, що свідчить про аналогічний високий вихід вірусів (таблиця).

На основі новітньої технології запропоновано принципову блок-схему (алгоритм) виді-

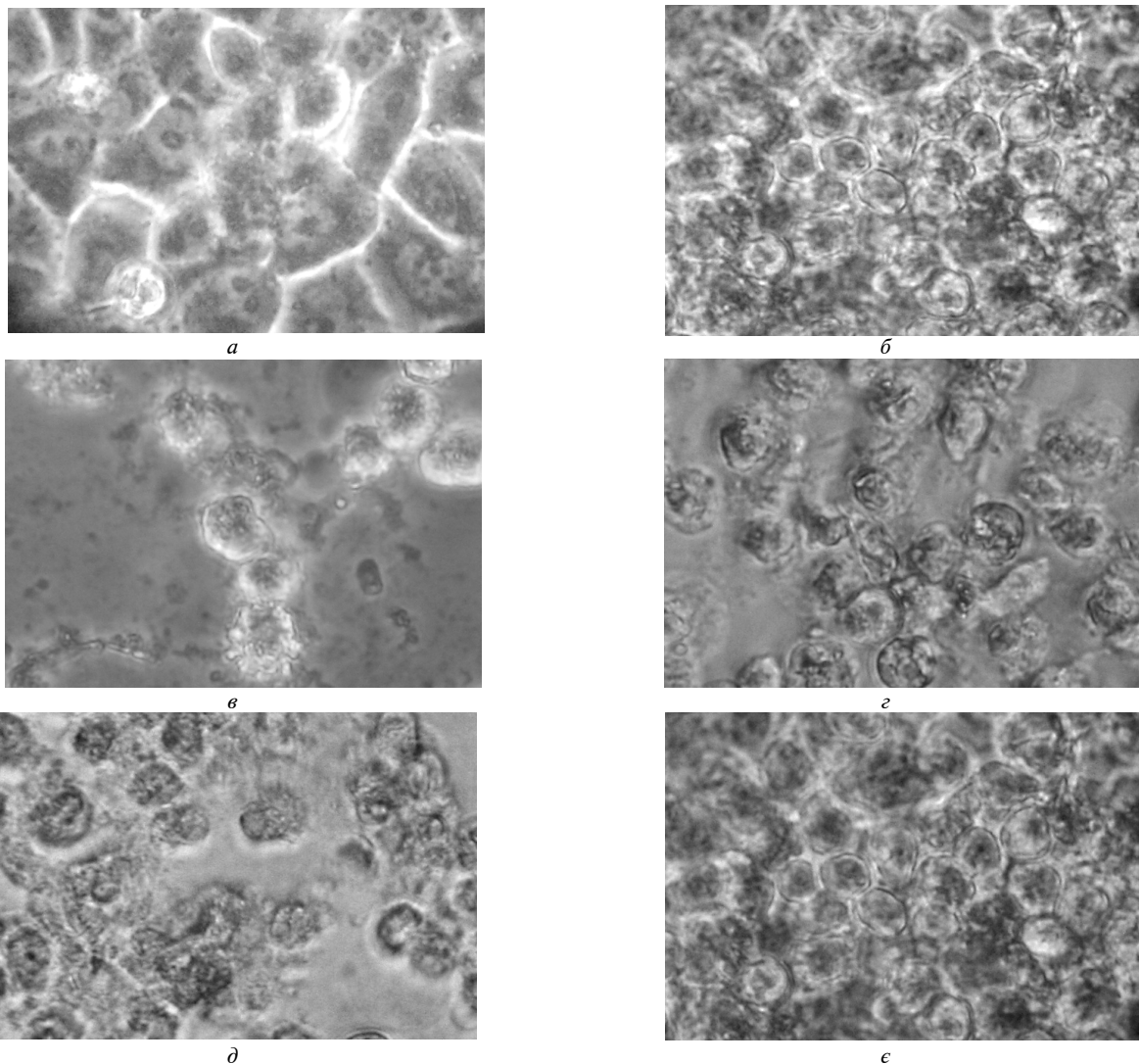


Рис. 2. Цитопатична дія свіжовиділених штамів ротавірусів людини в культурі клітин L-41 ($\times 40$). *a* – неінфікована культура клітин; *б* – ЦПД музейного штаму ротавірусу людини HRV-134; *в* – ЦПД музейного штаму ротавірусу мавп SA-11; *г* – ЦПД свіжовиділеного штаму ротавірусу людини № 389; *д* – ЦПД свіжовиділеного штаму ротавірусу людини № 390; *е* – ЦПД свіжовиділеного штаму ротавірусу людини № 391

Таблиця. Визначення антигенного титру ротавірусів у культуральній рідині в РНГА (на прикладі трьох свіжовиділених штамів)

Зразок РВ	Титр РВ
Еталонні штами	
SA-11, зразок № 382*	1:256
HRV-134, зразок № 383	1:256
Свіжовиділені штами	
Зразок № 389	1:256
Зразок № 390	1:128
Зразок № 391	1:256

Примітка. * – тут і надалі номери зразків подані згідно з нумерацією в журналі поточного пасажування вірусів кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика.

лення та адаптування до умов культивування штамів ротавірусів, яка дасть можливість уніфікувати процес виділення ротавірусів із клінічного матеріалу для подальших досліджень (рис. 3).

Висновки

В результаті проведених досліджень було розроблено біотехнологію виділення ротавірусів людини в культурі клітин та їх адаптації до умов культивування.

Розроблена технологія дала змогу виділити в культурі клітин і адаптувати до умов культивування 25 циркулюючих на території України

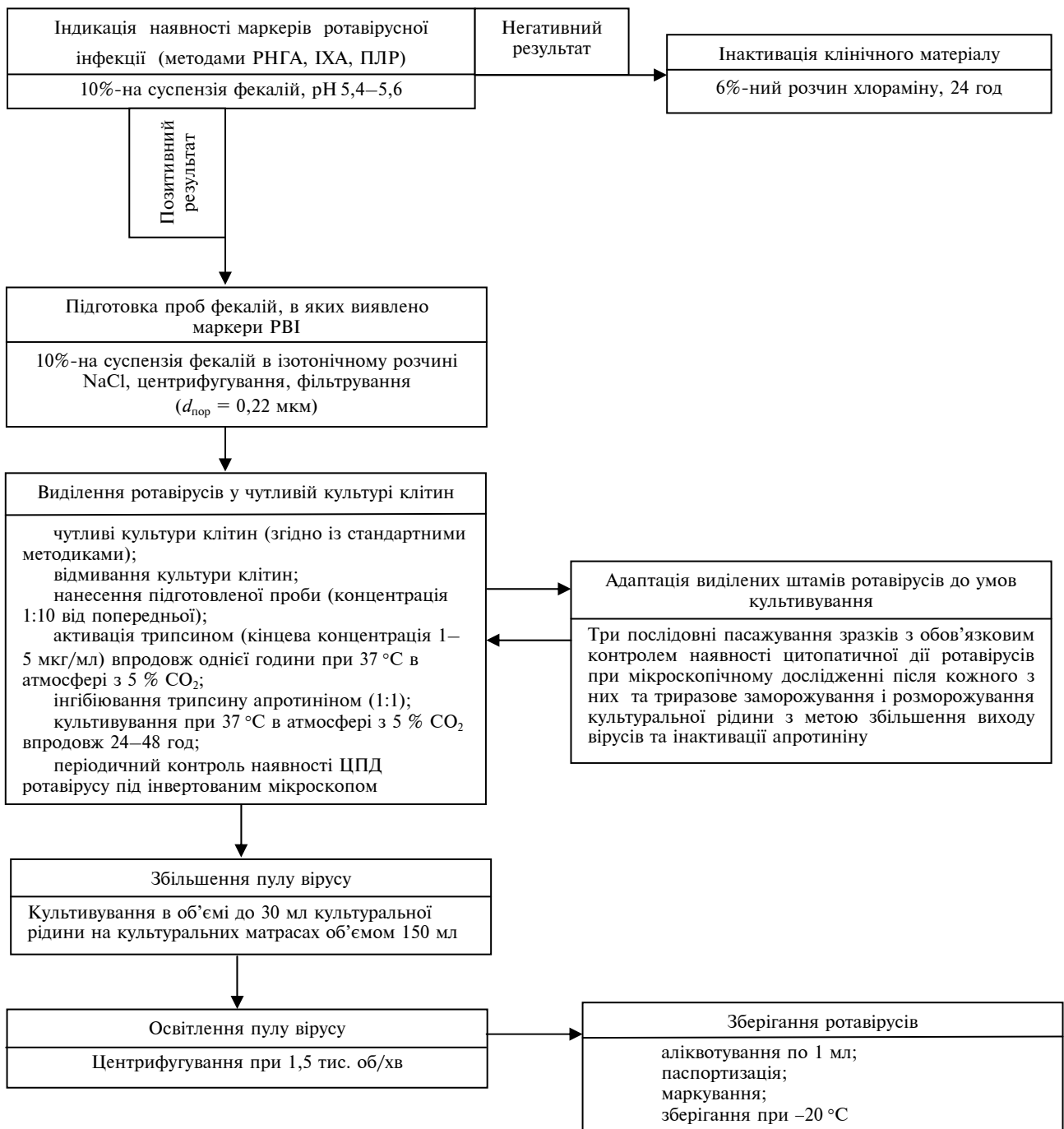


Рис. 3. Принципова схема виділення ротавірусів людини з клінічного матеріалу та адаптації їх до умов культивування

штамів ротавірусів, які внесено до колекції кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика. Створення такої колекції дасть можливість у подальшому відповісти на питання: ротавіруси яких серотипів циркулюють сьогодні на території України, вивчити їх молекулярно-біологічні властивості та виявити їх медичне значення.

Це допоможе в прогнозуванні ефективності та наслідків застосування на території України імунобіологічних препаратів для специфічної профілактики ротавірусної інфекції, що містять рекомбінантні та атенуйовані штами ротавірусів певних серотипів.

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

ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ РОТАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ИХ АДАПТАЦИЯ К УСЛОВИЯМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В последние годы на Украине ротавирусная инфекция получила значительное распространение, однако до сих пор не определено, какие штаммы ротавирусов человека циркулируют на ее территории, и не изучены их биологические свойства. Для этого разработана биотехнология выделения ротавирусов человека в культуре клеток, их адаптации к условиям культивирования, изучения биологических свойств и создания коллекции штаммов ротавирусов, циркулирующих на территории Украины.

S.O. Solovyov, O.P. Trokhimenko, L.G. Zholner,
O.A. Shulga

THE FEATURES OF HUMAN ROTAVIRAL SELECTIVE BIOTECHNOLOGY IN CELL CULTURE AND THEIR ADAPTATION TO CULTIVATION CONDITIONS

In the recent years rotaviral infection has proliferated in Ukraine. The problem is that the scientists have not yet determined which human strains of rotaviruses circulate in its territory and their biological properties. Hence we develop the biotechnology of human rotaviruses isolation in the cell culture and their adaptation to the cultivation conditions. We also study their biological properties and create the collection of rotavirus strains, circulating in the territory of the Ukraine.

1. *Дзюблик І.В., Шунько Є.Є., Катоніна С.П. та ін.* Ротавірусна інфекція: Навчально-методичний посібник / За ред. І.В. Дзюблик. – К.: Олпринт, 2004. – 116 с.
2. *Gray J., Vesikari T., Van Damme P. et al.* Rotavirus // *J. of paediatric Gastroenterology and Nutrition.* – 2008 (May). – **46**, – P. 24–31.
3. *Vesikari T., Van Damme P., Giaquinto C. et al.* European Society for Paediatric Infection Disease / European Society for Paediatric Gastroenterology, Haepatology and Nutrition Evidence-Based Recommendations for Rotavirus Vaccination in Europe // *J. of paediatric Gastroenterology and Nutrition.* – 2008 (May). – **46**, – P. 38–48.
4. *Дзюблик І.В., Обертинська О.В., Костенко І.Г. та ін.* Поширення ротавірусів у водних об'єктах довкілля України // *Інфекційні хвороби.* – 2008. – № 4. – С. 38–43.
5. *Дзюблик І.В., Обертинська О.В.* Прості/ швидкі тести в діагностиці вірусних інфекцій // *Лабораторна діагностика.* – 2008. – № 4(46). – С. 3–9.
6. *Васильев Б.Я., Васильева Р.И., Лобзин Ю.В.* Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция. – СПб.: Лань, 2000. – 272 с.
7. *Gray J. and Desselberger U.* Rotavirus: basic facts. In *Rotaviruses Methods and Protocols.* – Ed. Humana Press, 2000. – С. 258.
8. *University of Maryland Medical Center* <http://www.umm.edu/altmed/drugs/aprotinin-008360.htm>

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
15 липня 2009 року