

УДК 578.833.41:578.53

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ, ВЫДЕЛЕННЫХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

© 2012 г. Ж. В. Бузицкая<sup>1\*</sup>, А. К. Сироткин<sup>1</sup>, Т. М. Гудкова<sup>1</sup>, А. Р. Прочуханова<sup>1</sup>,  
А. В. Карпов<sup>2</sup>, Л. М. Цыбалова<sup>1</sup>, О. И. Киселев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376

<sup>2</sup>442-й Окружной военный клинический госпиталь им. З.П. Соловьева, Санкт-Петербург, 193163

Поступила в редакцию 03.11.2011 г.

Принята к печати 22.12.2011 г.

В рамках надзора за заболеваемостью краснухой в северо-западном регионе РФ проведен анализ мазков из носа и зева от 37 больных краснухой, находящихся на лечении в Окружном военном клиническом госпитале № 442 им. З.П. Соловьева. Для выделения вируса использовали клеточную линию RK-13, всего выделено 22 штамма. Штаммы вируса краснухи, выделенные в Санкт-Петербурге в период вспышки заболевания в 2007 г., принадлежат к генотипу 1Е. В культуре клеток RK-13 обнаружены изменения клеточного морфогенеза и формирование репликативных комплексов, а также оболочек вирионов вирусов краснухи.

**Ключевые слова:** вирус краснухи, клеточная линия RK-13, морфогенез, секвенирование, генотип 1Е.

MOLECULAR-BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE RUBELLA VIRUS STRAINS ISOLATED IN ST. PETERSBURG, by Zh. V. Buzitskaya<sup>1\*</sup>, A. K. Sirotkin<sup>1</sup>, T. M. Gudkova<sup>1</sup>, A. R. Prochukhanova<sup>1</sup>, A. V. Karpov<sup>2</sup>, L. M. Tsybalova<sup>1</sup>, O. I. Kiselev<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of Russia, St. Petersburg, 197376 Russia, \*e-mail: janna@influenza.spb.ru; <sup>2</sup>Solovyov 442nd District Military Hospital, St. Petersburg, 193163 Russia). In the surveillance of rubella in the northwest region of Russia samples of nasopharyngeal swabs from 37 patients with rubella, which were treated in the 442nd district military hospital named after Z.P. Solovyov in autumn 2007 were screened for the rubella virus using RK-13 cell line, 22 strains of rubella virus were isolated. Gene sequencing of E1 region of rubella virus isolates was carried out. Rubella virus strains isolated in St. Petersburg during the 2007 outbreak belonged to rubella virus genotype 1E. The morphogenesis of RK-13 cells with formation of replication complexes and enveloped virions of rubella virus was shown.

**Keywords:** Rubella virus, tissue culture RK-13, morphogenesis, sequencing, 1E genotype.

Эпидемиологическая и социальная значимость краснухи обусловлена повсеместным распространением инфекции и тератогенным действием вируса, так как он вызывает врожденные дефекты развития, приводящие к инвалидности или гибели новорожденных [1–4].

В России до конца 90-х годов краснуха оставалась неуправляемой инфекцией. Широкомасштабная вакцинация, начатая в 2001 г., привела к значительному снижению уровня заболеваемости. В 2008 г. в Санкт-Петербурге заболеваемость краснухой составила 8.3, а по России – 6.8 случаев на 100 000 населения [5]. Однако предписанный Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) уровень охвата населения прививками (95%) в нашей стране не достигнут, и наблюдается

тенденция к увеличению доли взрослого населения, в том числе женщин репродуктивного возраста, заболевающих краснухой [6]. Ежегодно регистрируемые вспышки по-прежнему определяют высокую вероятность развития синдрома врожденной краснухи у новорожденных.

Изучение молекулярно-генетических свойств вирусов краснухи, циркулирующих в различных регионах, позволяет распознавать эндогенные или завозные случаи заболевания и оценивать эффективность элиминации эндемичной краснухи, которая, в соответствии со стратегией ВОЗ, должна была быть закончена к 2010 г. [7].

Геном вируса краснухи представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, которая содержит две открытые рамки считывания, кодирующие неструктурные (NSP1 и NSP2) и структурные (С, Е2 и Е1) белки [8]. Поверхност-

\* Эл. почта: janna@influenza.spb.ru

ный белок E1 играет важную роль в процессе узнавания вируса клеточными рецепторами, связывания вирусной поверхности с мембраной клетки хозяина и содержит эпитопы, определяющие гемагглютинирующую и антителонейтрализующую активности [8]. Последовательность гена белка E1 в высшей степени консервативна (>95%) [9]. Стандартные молекулярно-эпидемиологические исследования вируса краснухи, которые основаны на анализе фрагмента последовательности гена E1, картированного между 8731–9469 н. (так называемого “стандартного эпидемиологического окна”), позволяют определять принадлежность изолятов к тому или иному генотипу и изучать циркуляцию штаммов и географическое распределение генотипов вируса краснухи [10]. Выделяют две основные генетические линии вируса. В пределах первой выделяют семь генотипов (1a, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F и 1g), в пределах второй – три (2A, 2B и 2c) [11, 12]. Вирусы 1-ой генетической линии встречаются повсеместно, тогда как вирусы 2-ой циркулируют преимущественно на территории Италии, Китая, Южной Кореи и Индии. До настоящего времени охарактеризованы российские вирусы 1967–1997 г. выделения, которые сформировали отчетливую группу, стоящую совершенно обособленно от широко распространенного генотипа 1 (межгрупповая дивергенция 6.20–8.21%), но и не были генетически подобны штаммам генотипа 2. Это свидетельствовало о существовании еще одного генотипа, и штаммы, изолированные в России и эндемичные для нее, были классифицированы как генотип 2c [7, 11, 12, 13].

В данной работе исследованы молекулярно-биологические свойства и динамика морфогенеза вирусов краснухи, выделенных на территории Санкт-Петербурга в 2007 г.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для выделения вируса краснухи из материала мазков из носа и зева использовали перевиваемую линию клеток почек кролика RK-13, выращенную на пробирках “Nunc” (Германия). После образования монослоя клетки заражали вирусом краснухи. Зараженные культуры инкубировали при 34°C в течение 6 дней. В качестве поддерживающей среды применяли питательную среду 199 с бычьим сывороточным альбумином, фракция V (“Sigma”, США), с добавлением 1 М раствора НЕРЕС (“Sigma”) и 50 мкг/мл гентамицина (“Gibco”, США).

Материал для электронно-микроскопического исследования брали спустя 24, 48 и 72 ч, 4 и 6 сут после заражения, контролем служили незараженные клетки. Клетки фиксировали 1 ч в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодилатном буфере, затем 1%-ным раствором осмие-

вой кислоты, обезвоживали и заливали в эпоналдит. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме “Ultracut” (“Reichert-Jung”, Германия) и после контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (“JEOL”, Япония).

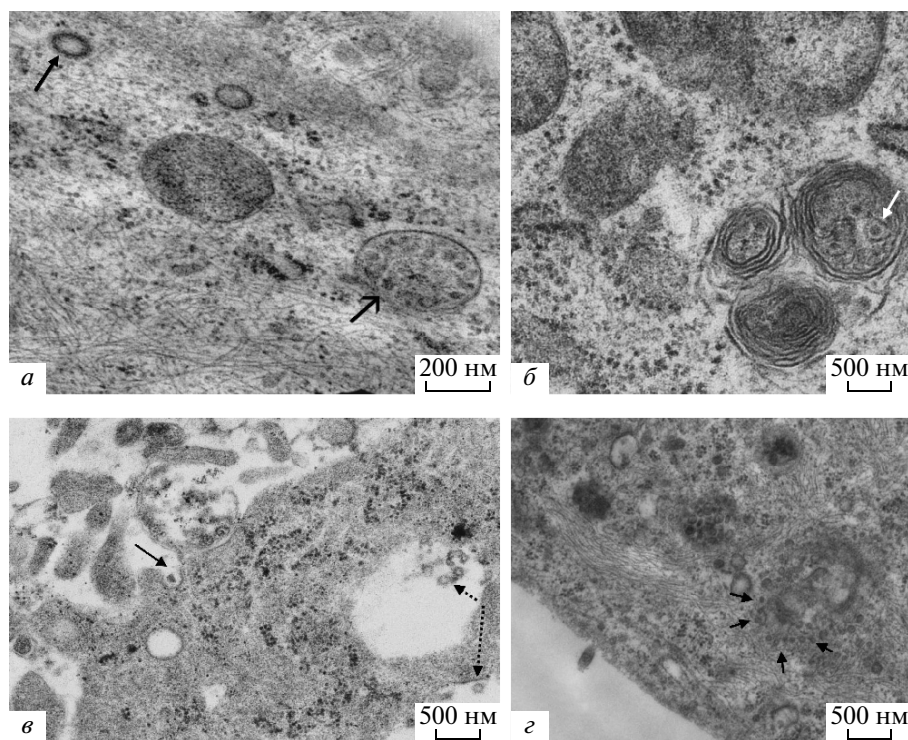
Наличие РНК вируса краснухи в клеточной суспензии определяли при помощи метода ПЦР с использованием набора “АмплиСенс® Rubella virus-FL” с флуоресцентной детекцией производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия. Присутствие полноценных вирионов в культуральной среде подтверждали методом протравливающей электронной микроскопии. Амплификацию фрагмента гена E1 вируса краснухи проводили, используя оригинальные праймеры (*R222F* 5'-ACTgCACCGgggTgCgCCAC-3; *R832R* 5-CgTgACCCACACCTCgCCgg-3; *R629F* 5-ACAC-CggCAATCAgCAgTCC-3; *R1434R* 5-TATAgCgC-CgCgCAAgTAgT-3). Последовательности нуклеотидов выделенных фрагментов определяли на приборе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer с использованием наборов “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” 3.1, (“Applied Biosystems”, США). Для филогенетического анализа использовали программу MEGA v3.1 (PSU, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Осенью 2007 г. 37 человек мужского пола в возрасте от 15 лет до 21 г. (средний возраст 18 лет), поступили в Окружной военный клинический госпиталь № 442 им. З.П. Соловьева из военных училищ Санкт-Петербурга спустя 1–3 дня от начала заболевания с жалобами на слабость, боли в суставах, насморк. При объективном исследовании у всех больных выявлялась мелкопапулезная сыпь на теле и лице, увеличение затылочных лимфатических узлов. У 32 больных на момент поступления отмечали повышенную температуру тела (37.1–39.2°C), которая нормализовалась в течение первых трех дней пребывания в стационаре. У 32 человек отмечались симптомы конъюнктивита. У всех больных на 2–9 дни с момента появления сыпи были взяты образцы отделяемого из носа.

Из клинических образцов больных выделены 22 штамма вируса краснухи (SPb-1/Russia/2007 – SPb-22/Russia/2007), которые депонированы в Музее вирусов НИИ гриппа. В серии предварительных опытов с использованием клеточных линий RK-13, ВНК-21 и Vero показано, что эффективная репродукция вируса наблюдается в клеточной линии RK-13 (данные не приводятся). Эту линию клеток использовали для культивирования и исследования вируса.

Изучение морфогенеза клеток, зараженных штаммами вируса краснухи SPb-10/Russia/2007 и SPb-16/Russia/2007 через 24, 48, 72 ч, 4 и 6 сут по-



**Рис. 1.** Микрофотографии фрагментов клеток культуры RK-13, инфицированной вирусом краснухи. *а* — Образование репликативных комплексов вируса в инфицированных клетках через 24 ч после заражения (отмечены стрелками). *б* — Поздние репликативные комплексы с включением миелиноподобных мембранных образований и единичных нуклеокапсидов вируса краснухи (отмечено белой стрелкой) (48 ч после заражения). *в* — Образование эндосомы с вирусной частицей (отмечено стрелкой), поздняя лизосома с пустыми нуклеокапсидами (отмечено пунктирной стрелкой) (72 ч после заражения). *з* — Скопление нуклеокапсидов вируса в цитоплазме инфицированной клетки (отмечено стрелками), образование сети фибрилл (72 ч после заражения).

сле заражения показало, что в инфицированных клетках наблюдается гипертрофия аппарата Гольджи на всех сроках. Это проявляется в увеличении количества и диаметра его цистерн и вакуолей, где, как известно, происходит гликозилирование поверхностных белков и формирование оболочек вирионов краснухи [4]. Через 24 ч в клетках происходили изменения, связанные с началом репликации вируса краснухи — образование репликативных комплексов с характерным расположением везикул под мембраной вакуолей (рис. 1*а*). Через 48 ч после заражения репликативные комплексы в инфицированных клетках претерпевали морфологические изменения: в них накапливались многослойные миелиноподобные мембранные структуры (рис. 1*б*). Отмечено также появление крупных вакуолей с вирионами, которые имели вид округлых образований диаметром 6080 нм с электронно-плотным нуклеокапсидом диаметром 30 нм в центре. Единичные вирионы можно наблюдать в участках цитоплазматического матрикса, окруженных элементами эндоплазматического ретикула. Их размер и строение не отличаются от строения вирионов, выявляемых в вакуолях и цистернах комплекса Гольджи. Одновременно с морфологическими признаками, ука-

зывающими на конечные стадии вирусной репликации, обнаруживали клетки, на цитоплазматической мембране которых были заметны эндоцитозные впячивания с располагающимися вблизи них вирусными частицами (рис. 1*в*). На поздних стадиях репродукции вируса в зараженных клетках наблюдали образование фибриллярных структур (рис. 1*з*), которые, вероятно, используются вирусом для передачи от клетки к клетке не упакованного в вирусную частицу генетического материала [14]. В целом, морфологические изменения в инфицированных клетках соответствуют описанным ранее [4].

Изучение ряда биологических свойств вируса *in vitro* показало, что в случае штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге в 2007 г., для выделения и накопления вируса оптимальными являются клеточная линия RK-13 и период инкубации до 5 сут.

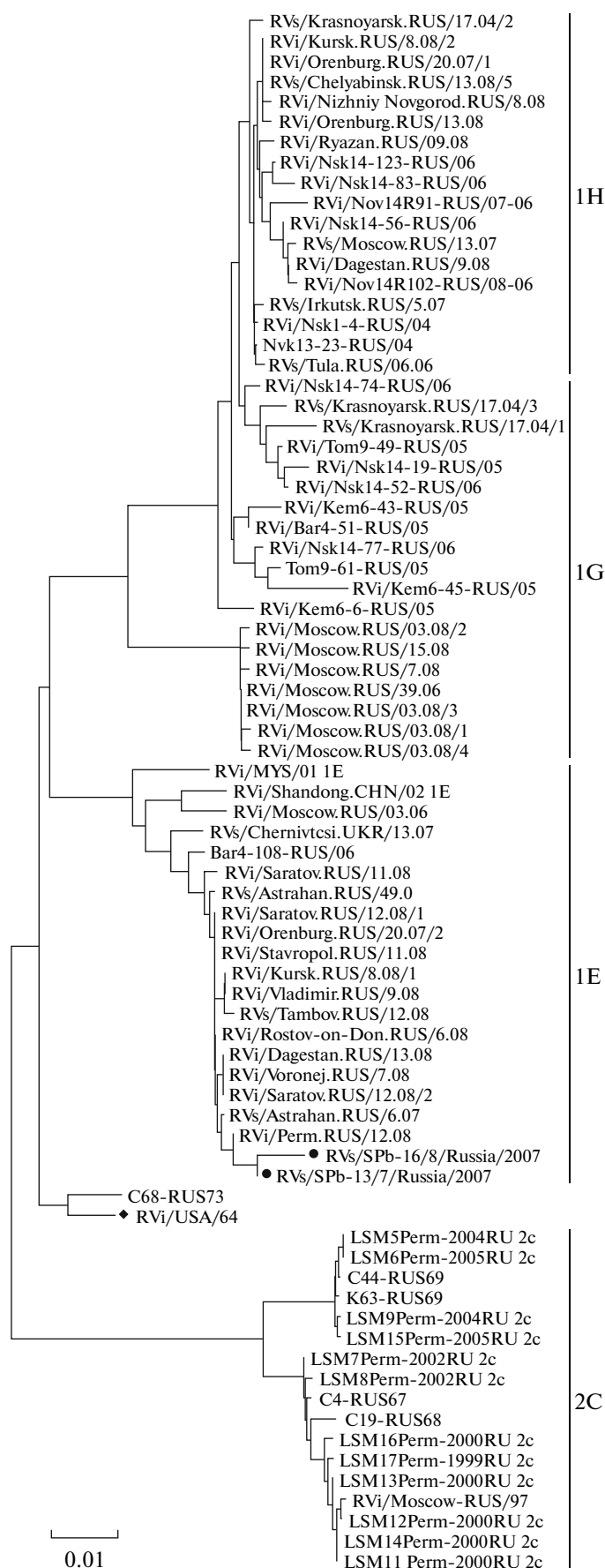
На следующем этапе исследования изучали молекулярную характеристику штаммов вируса краснухи, выделенных во время данной вспышки заболевания. Поскольку образцы собраны от больных из одной вспышки заболевания и в один период времени, а выделенные штаммы вируса имеют сходные ростовые характеристики, анали-

**Рис. 2.** Филогенетическое дерево штаммов вируса краснухи по гену E1, выделенных на территории России. ● — Отмечены штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге в 2007 г.

зировали нуклеотидные последовательности только двух штаммов вируса краснухи SPb-13/7/Russia/2007 и SPb-16/8/Russia/2007. Для филогенетического анализа определяли последовательность участка гена E1 длиной 600 н. (в пределах рекомендованного “эпидемиологического окна”). Филогенетический анализ показал, что относительно вакцинного штамма RA 27/3 (генотип 1a), используемого в России, упомянутые штаммы имеют незначимые нуклеотидные замены, большинство из которых (75%) — замены T→C. Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями участка гена E1 репрезентативных и вакцинных штаммов вирусов краснухи, представленных в Международной базе данных GenBank, показал, что штаммы, выделенные на территории Санкт-Петербурга в 2007 г., принадлежат к генотипу 1E (рис. 2). Известно, что генотип 1E широко распространен в Европе и до 2006 г. не встречался на территории РФ [15].

В условиях массовой иммунизации детей и женщин детородного возраста в Санкт-Петербурге уровень заболеваемости краснухой снизился практически до нуля. Единичные немногочисленные вспышки заболеваемости, как правило, регистрируются в закрытых коллективах, где велика вероятность тесного контакта с больным краснухой. Изученная нами вспышка заболевания среди курсантов военных училищ явилась последней, на сегодняшний день, зарегистрированной вспышкой в Санкт-Петербурге.

Филогенетический анализ штаммов вируса краснухи, выделенных на территории России с 1967 г. по настоящее время, показал, что до 2004 г. для территории России была характерна циркуляция штаммов вируса краснухи генотипа 2c, но, начиная с 2004 г., отмечено появление штаммов, принадлежащих к генотипам 1E, 1g, 1h (рис. 2). Принадлежность выделенных в Санкт-Петербурге в 2007 г. штаммов вируса краснухи к генотипу 1E позволяет предположить, что данные штаммы завезены на территорию Санкт-Петербурга из граничащих с Россией Европейских стран. В 2009 г. в базе данных GenBank появились последовательности российских штаммов вируса краснухи выделения 2006–2008 гг., среди которых наиболее часто встречается генотип 1h, реже 1E и 1g, и отсутствует генотип 2c. Это позволяет предположить, что на территории России эндемичный вирус элиминирован в результате национальной программы массовой иммунизации, а отдельные случаи заболевания краснухой можно расцени-



вать, как случайные, связанные с миграцией населения и развитием туризма.

Авторы выражают искреннюю благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории клеточных культур ФГБУ “НИИ гриппа” Минздравсоцразвития России Т.Д. Смирновой за предоставленную для работы клеточную культуру.

Работа получила финансовую поддержку Проекта МНТЦ “Совершенствование и стандартизация лабораторных и эпидемиологических методов надзора за краснухой в Российской Федерации” (№ 3373).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зверев В.В., Десяткова Р.Г. 2004. Врожденная краснуха. *Вакцинация*. **6**, 7–8.
2. Анджапаридзе О.Г., Червонский Г.И. 1975. *Краснуха*. М.: Медицина, с. 102.
3. Канторович Р.А., Володина Н.И., Телешевская Э.А. и др. 1979. Бюллетень ВОЗ. **57**, 445–452.
4. Lee J.-Y., Bowden D.S. 2000. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 571–587.
5. Цыбалова Л.М., Тимофеева Е.В., Бузицкая Ж.В., Гудкова Т.М., Максакова В.Л., Парков О.В. 2009. Эпидемический процесс при краснухе в условиях массовой иммунизации детей. *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунологии*. **5**, 47–51.
6. Онищенко Г.Г. 2008. Государственный доклад “О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2008 году”. [Электронный ресурс]: // [http: www.saphia.ru](http://www.saphia.ru)
7. WHO. 2006. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second Edition. Geneva.
8. Hofmann J., Renz M., Meyer S., von Haeseler A., Liebert U.G. 2003. Phylogenetic analysis of rubella virus including new genotype I isolate. *Virus Res.* **96**, 123–128.
9. Frey T.K., Abernathy E.S., Bosma T.J., Starkey W.G., Corbett K.M., Best J.M., Katow S., Weaver S.C. 1998. Molecular analysis of rubella virus epidemiology across three continents, North America, Europe, and Asia, 1961–1997. *J. Infect. Dis.* **178**, 642–650.
10. WHO. 2005. Standardization of the nomenclature for genetic characteristics of wild-type rubella viruses. *Report*. **8**, 126–132.
11. Zheng D.P., Frey T.K., Icenogle J., Katow S. 2003. Global distribution of rubella virus genotypes. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1532–1530.
12. Zheng D.P., Iarulin V.R., Zverev V.V., Il'iasov Iu.Iu. 2005. Genotypes of rubella viruses circulating in Russia. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **6**, 19–23.
13. Лаврентьева И.Н., Семериков В.В., Жебрун А.Б., Фельдблюм И.В., Марков А.В. 2008. Краснуха в России: изменчивость возбудителя в период вакцинопрофилактики инфекции. *Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунологии*. **3**, 26–31.
14. Matthews J.D., Tzeng W.P., Frey T.K. 2010. Analysis of the function of cytoplasmic fibers formed by the rubella virus nonstructural replicase proteins. *Virology*. **406**, 212–227.
15. Abernathy E.S., Hübschen J.M., Muller C.P., et al. 2011. Status of global virologic surveillance for rubella viruses. *J. Infect. Dis.* **204**, 524–532.