

УДК:578.3:578.829.91

Новая группа ротавирусов человека семейства Reoviridae

Колпаков Сергей Анатольевич, Колпакова Елена Павловна

Аннотация:

Главной целью исследования была адаптация ротавируса человека к росту в перевиваемой культуре животных клеток. В ходе работы выяснилось, что выделенные и адаптированные штаммы вирусов, получившие рабочее название - ротавирусы группы К, нельзя отнести ни к одной из известных групп ротавирусов человека. Созданная на их основе диагностическая тест система позволила выявить ротавирусы группы К у 75 % детей, больных инфекционными гастроэнтеритами, причём в 50 % случаев у них же были обнаружены и ротавирусы группы А, что было полностью подтверждено электронной микроскопией и выявлением РНК ротавирусов группы К в пробах.

Полученные данные, на наш взгляд, имеют важное научное и практическое значение, так как могут изменить устоявшееся мнение о ведущей роли ротавирусов группы А при инфекционных гастроэнтеритах у детей.

Ключевые слова: ротавирусы, гастроэнтериты, электрофорез, сегментированная РНК, новая группа ротавирусов человека.

Abstract:

Key objective of the given research is to find out reasons of failures during extraction of the RNK reoviruse from sick people clinical material. In due course it was discovered that transcriptase (RNA dependent RNA polymerase) very quickly transforms double-stranded RNA into a single-stranded RNA due to short time of activation after violation of reoviruse outside capsid integrity. This single-stranded RNA is invisible using standard way of electrophoresis registration. Addition of a transcriptase with polymerase function in ready-made samples or in clinical material from sick people before RNA extraction leads to transformation of a single-stranded RNA (if available) into a dsRNA identified after electrophoresis in the form of genome's segments. The developed RNA visualisation method could assist in etiological diagnostics of reoviral infection and in studying of reovirus as a pathogen.

Eng.: rotavirus gastroenteritis, electrophoresis, segmented RNA, a new group of human rotavirus.

Вступление

Ротавирусы, представители одноимённого рода семейства Reoviridae были открыты уже более 60 лет назад, однако, вызываемые ими гастроэнтериты остаются актуальными до сих пор. Согласно классификации, ротавирусы разделены на 7 групп - А, В, С, Д, Е, F, и G, антигенно не связанных друг с другом. При этом, заболевания у людей и животных могут вызывать представители первых трёх групп, а остальные обнаруживаются только у животных.

Геном всех вирусов этого семейства представлен уникальной двунитчатой сегментированной РНК, разделяющейся при электрофорезе (ЭФ) на сегменты,

причём у реовирусов их **10**, а у ротавирусов-**11** [7]. Ещё одной важной и уникальной особенностью ротавирусов, в отличие от всех остальных представителей семейства, является их потребность в трипсине, без которого воспроизводство вирусного потомства невозможно [4].

Ротавирусы группы А (рис. 1), возбудители вирусной инфекции с ярко выраженной сезонностью (ноябрь-март), играют ведущую роль в кишечной патологии, особенно у детей до 2-х лет, являясь причиной возникновения от 45 до 50% всех ГЭ инфекционной природы [1-6].

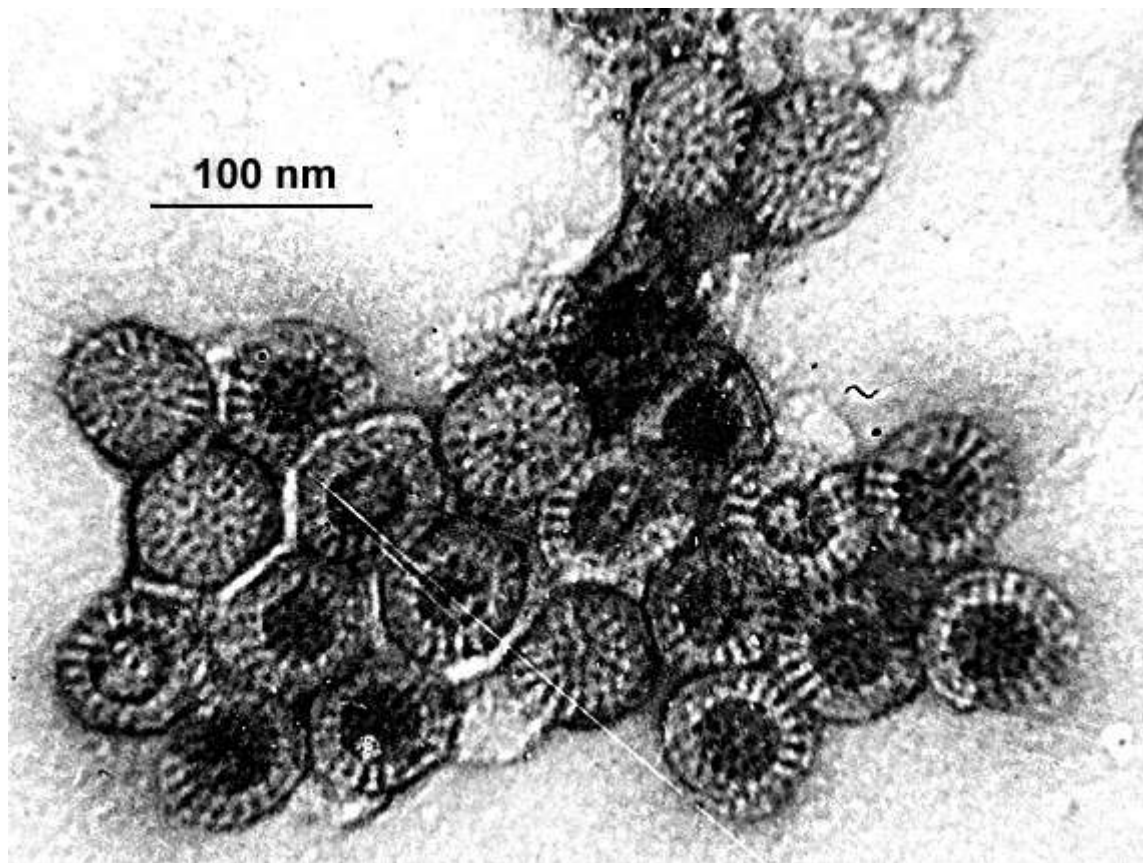


Рисунок 1. Электронномикроскопическая фотография: ротавирусы человека группы А. Негативное контрастирование. Ув. 200 000. Препарат Колпакова С.А.

Ротавирусы групп В и С выглядят на этом фоне значительно скромнее - на их долю приходится от 3-х до 8% вирусных ГЭ [8].

Целью настоящей работы была адаптация ротавирусов человека к росту в перевиваемой культуре клеток для создания на их основе диагностических тест-систем, а также для изучения возможности применения адаптированных штаммов ротавируса человека в качестве вакцинных.

Материалы и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуру перевиваемых клеток эмбриона свиньи (СПЭВ), культивируемую на среде 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС).

Вирусы. Фекальные 10 % суспензии готовили по обычной методике. Перед заражением клетки три раза промывали раствором Хенкса и наслаивали предварительно обработанные 0,25% раствором трипсина суспензии фекалий больных детей, в которых методом электронной микроскопии (ЭМ) были обнаружены ротавирусы. После контакта восстанавливали первоначальный объём питательной средой без сыворотки и оставляли в термостате при 37 ° С.

Каждый пассаж контролировали на наличие ротавируса методом ЭМ на микроскопе УМВ-100К при инструментальном увеличении 65000-85000.

Выделение РНК. РНК ротавирусов и реовирусов выделяли, как описано в [3] с незначительными авторскими модификациями.

Электрофорез. Вертикальный электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) (pH-8,8) с концентрирующим 4% гелем (pH-5,8) при токе 8-15 мА в течение 15-24 часов.

Диагностикумы. Для детекции ротавирусов группы А, кроме ЭМ, использовали разработанный нами ранее антительный эритроцитарный диагностикум «Ротатест» для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) [1-2].

Диагностикум представляет собой 1% взвесь фиксированных эритроцитов барана, сенсibilизированных γ -глобулиновой фракцией асцитной жидкости белых крыс, иммунизированных ротавирусом обезьян SA-11.

Диагностикум «Ротатест-К» получен по указанной выше технологии, но для иммунизации крыс брали соответственно ротавирусы группы К.

Животные. Использовали белых беспородных крыс весом 120-150 гр. Для получения штаммоспецифических антител каждую группу крыс иммунизировали «своим» штаммом ротавируса. После 8-ой иммунизации животным вводили в брюшную полость опухоль яичника крыс (штамм ОЯ) и через 10-15 дней собирали иммунное сырьё в виде иммунной асцитной жидкости.

Результаты

Для адаптации ротавирусов мы отбирали пробы, в которых по данным ЭМ количество двухкапсидных вирионов ротавируса было максимально, так как наличие внешнего капсида связано с инфекционностью - способностью вируса заражать живую клетку. Принадлежность этих ротавирусов к группе А была подтверждена в РНГА с «Ротатестом». Потребовалось несколько «слепых» пассажей, прежде чем все взятые в работу штаммы ротавируса стали демонстрировать характерные признаки повреждения клеток. Начиная с 4-ого пассажа, через 48 часов наступала полная деструкция монослоя клеток. С каждым последующим заражением количество ротавируса нарастало и через некоторое время, нам удалось довести его урожай на уровне 10-16 пассажа до $1 \cdot 10^9$ - $6 \cdot 10^9$ вирионов в 1 мл культуральной жидкости.

Всего было адаптировано 18 штаммов ротавируса, которые при ЭМ имели типичную для ротавирусов всех групп морфологию и не размножались без предварительной обработки трипсином (рис. 2).

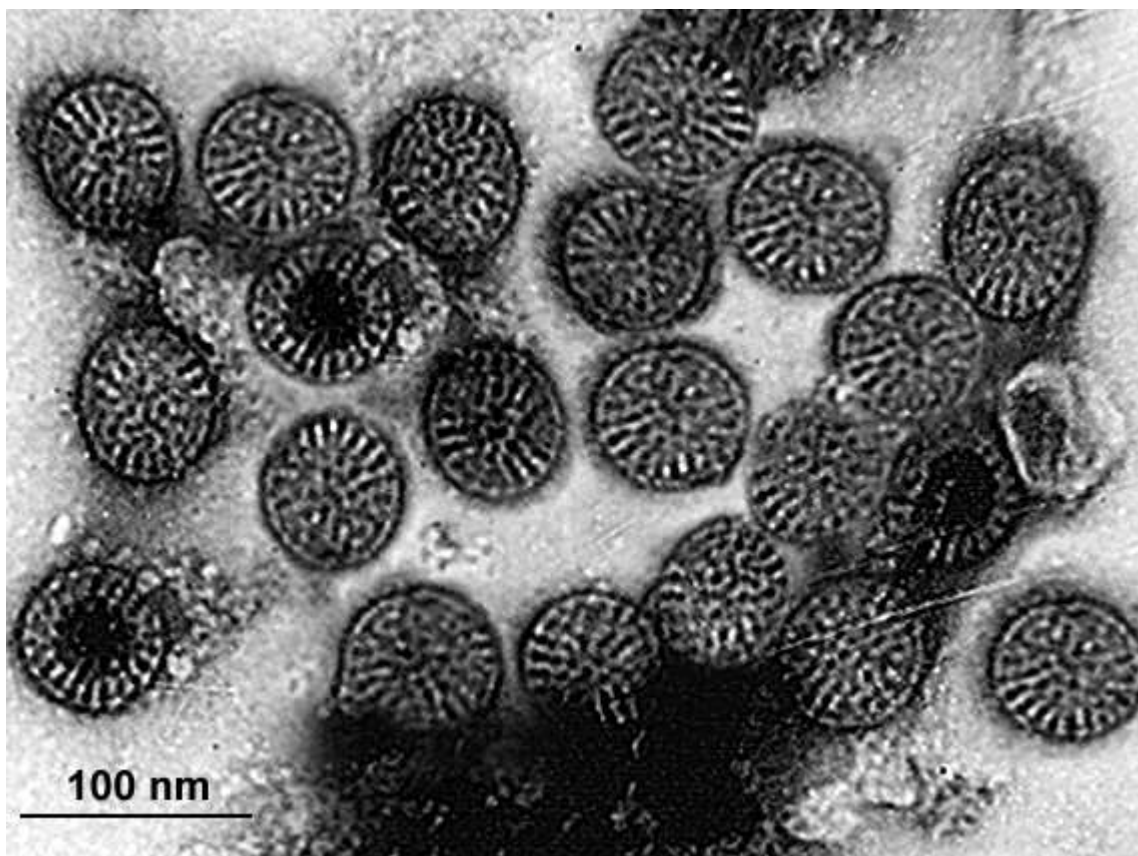


Рисунок 2. Электронномикроскопическая фотография: культуральные ротавирусы человека группы К (РВК). Негативное контрастирование. Ув. 200 000. Препарат Колпакова С.А.

А поскольку в работу были взяты пробы фекалий, положительные в РНГА с «Ротатестом» на ротавирус группы А, мы нисколько и не сомневались в принадлежности к этой же группе адаптированных нами штаммов и других методов контроля не применяли.

Неожиданности начались после того, как мы решили дать количественную характеристику (титры) культуральных штаммов ротавируса человека в РНГА. Ни один из адаптированных штаммов ротавируса не реагировал с «Ротатестом», что сначала показалось нам совершенно невозможным, так как диагностикум прекрасно «работал» с антигеном ротавируса обезьян SA-11, выявляя его в разведении 1:4000. Однако, наличие в этих пробах большого количества ротавирусов при ЭМ, могло говорить только о том, что выращенные нами на культуре клеток вирусы, не относятся к ротавирусам группы А.

Принадлежность к одной из остальных групп можно было бы установить в реакции нейтрализации (РН) на культуре клеток с помощью антисывороток, но из-за их отсутствия это пока невозможно. Оставался ещё один путь - электрофорез в ПААГ ротавирусной РНК, позволяющий по геному оценить принадлежность изучаемого штамма к той или иной антигенной группе.

Первый же ЭФ РНК наших ротавирусов показал, что их электрофоретип нельзя отнести ни к одной из известных на сегодняшний день группе ротавирусов. Для удобства обозначения авторы предлагают для них рабочее название - ротавирусы группы К (РВК). На рис.3а представлен ЭФ РНК 3-х культуральных штаммов РВК (треки №2-4) и 4-х штаммов ротавируса группы А различных электрофорети-

пов (треки №5-8), выделенных от больных ротавирусными ГЭ, причём в пробе №5 обнаружены ротавирусы сразу 2-х форотипов. Здесь и далее в скобках представлены номера анализов по рабочему журналу.

Гены РВК оказались в 1,5-2 раза тяжелее генов ротавируса группы А, а по характеру распределения сегментов похожи на ЭФ РНК реовируса (рис.3а, трек №1).

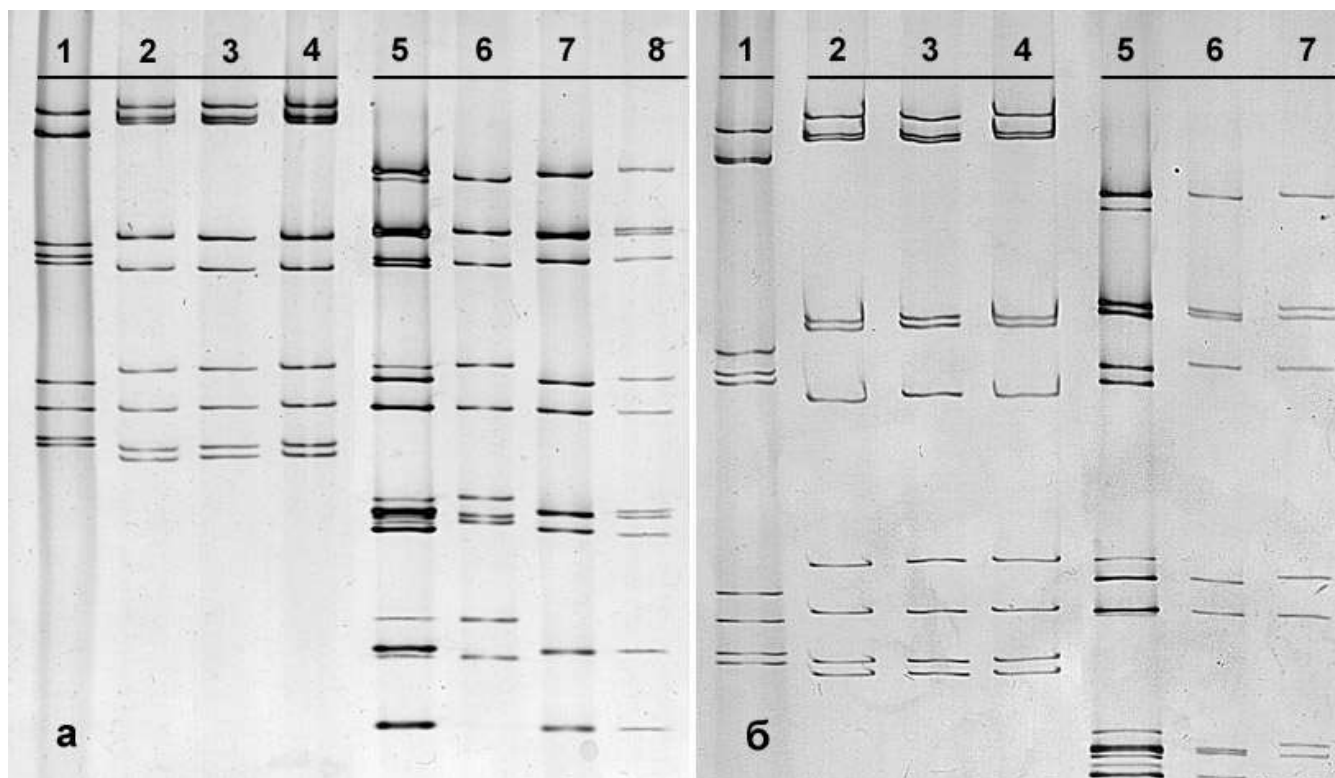


Рисунок 3. Электрофореграммы РНК: а - 1- культурального реовируса чело-века; 2- 4- культуральных ротавирусов группы К; 5- 8-ротавирусов человека группы А (5- №833, 6-№834, 7- №844, 8- №818). I- 10,0 мА, h-16 час. б- треки 1-7 как на "а"; 8-10- ротавирусов группы А (5- №833, 6- №837, 7- №818). I- 11,0 мА, h-20 час. "а" и "б" - ПААГ- 8%. Препарат Колпакова С.А.

Однако, если ток и время проведения ЭФ увеличить, становятся видны и существенные различия (рис.3б, треки №1и №2-4). Количество генов, визуально определяемых у РВК равно 10, но на каждой из почти 100 фореграмм, сделанных нами, 6-ой сегмент от начала старта всегда окрашивался в 1,5-2 раза интенсивнее, чем 4-ый и 5-ый, что может говорить о том, что генов всё же 11.

Интересные результаты получены при ЭФ проб, в которых одновременно находятся ротавирусы группы А и РВК: на рис. №4 (трек б) видно, что 6-ой ген ротавируса группы А всегда идёт слитно с 8-ым геном РВК.

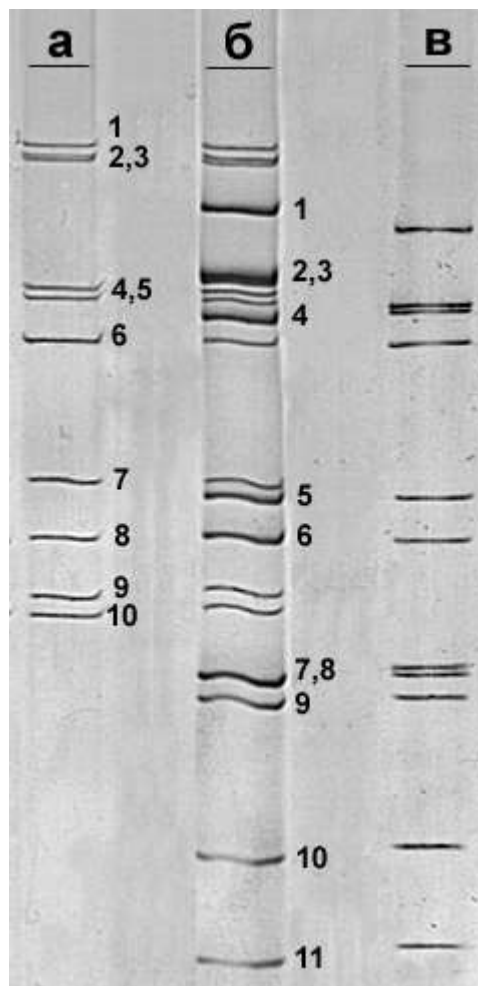


Рисунок 4. Электрофореграмма РНК: а -только РВК (№822), б - РВК вместе с ротавирусами группы А (№844); в -только ротавирусы группы А (№818). Первая колонка цифр показывает номера генов РВК, а вторая - номера генов ротавирусов группы А. I- 11,2 тА, h-18 час. ПААГ- 8%. Препарат Колпакова С. А.

Это говорит о том, что молекулярные массы этих генов одинаковы. А поскольку известно, что именно продукты 6-ого (капсомеры внутреннего капсида) гена ротавируса группы А ответственны за внешний вид вириона при ЭМ, то это и объясняет с одной стороны идентичность внешнего вида вирусов с таким непохожим профилем распределения РНК, а с другой стороны позволяет с достаточной долей вероятности предположить, что продуктами 8-ого гена РВК являются белки внутреннего капсида (групповая специфичность).

В качестве реовирусного стандарта мы использовали РНК культурального реовируса человека, выделенного от больного гепатитом и адаптированного к росту в культуре клеток СПЭВ. На основе этого вируса, нами был создан антительный эритроцитарный диагностикум "Реотест" для РНГА, выявляющий все 3 серотипа реовируса, поскольку известно, что они имеют общий группоспецифический антиген. Проверка в РНГА с «Реотестом» всех 9 штаммов РВК, взятых в работу, как и ожидалось, несмотря на большое количество вирусных частиц $-6 \cdot 10^9$ в 1мл культуральной жидкости, показала отрицательный результат. Таким образом, ещё одним методом подтверждена уникальность и самостоятельность новой группы ротавирусов. Именно группы, так как в перекрёстной РН на культуре клеток с моновалентными антисыворотками к каждому штамму ротавируса было определено не менее

трёх серотипов РВК. При этом все выделенные ротавирусы имели общий группоспецифический антиген, так как агглютинация с каждым штаммом РВК сенсibilизированных эритроцитов нового диагностикума, о котором сказано ниже, в равной мере подавлялась гомологичными и гетерологичными антителами.

Для изучения роли РВК в детской кишечной патологии был создан с использованием смеси антисывороток ко всем штаммам РВК поливалентный диагностикум, получивший рабочее название «Ротатест- К».

Диагностикум показал 100% специфичность, реагируя в высоких титрах только с РВК и не реагируя с ротавирусами группы А, реовирусами, аденовирусами и энтеровирусами. С его помощью исследовали в РНГА 235 фекальных суспензий от детей, больных инфекционными ГЭ. Одновременно в этих же суспензиях искали с помощью "Ротатеста" ротавирусы группы А.

Полученные результаты оказались чрезвычайно неожиданными и интересными. Более 75% проб оказались положительными на РВК, причём в 50 % из них выявлялись также и ротавирусы группы А. Реакция на РВК во всех случаях была специфичной, так как агглютинация эритроцитов подавлялась антителами против РВК. Наличие ротавирусов в пробах во всех случаях было подтверждено методом ЭМ. В отличие от ротавирусов группы А, частота выделения РВК от больных инфекционными ГЭ не связана с сезонностью и в процентном отношении равномерно распределена в течение всего года.

Обсуждение

Проведённая работа позволила не только выделить и адаптировать к росту в переливаемой культуре клеток неизвестную ранее группу ротавирусов человека, но и показать их чрезвычайно высокую распространённость у детей до 2-х лет жизни с кишечной патологией. Применение нового эритроцитарного диагностикума при обследовании детей, больных инфекционными ГЭ, выявило у 75 % всех обследованных ротавирусы новой группы, что в 100% случаев было подтверждено методами прямой просвечивающей ЭМ и ЭФ РНК РВК, выделенных из фекальных суспензий больных.

Полученные предварительные результаты, на наш взгляд, чрезвычайно интересны и требуют дополнительных исследований в этом направлении.

Список литературы

1. Дроздов С.Г. и др. Ротавирусная инфекция. М.1989, 32 с.
2. Колпаков С.А. Автореф. дис. ...кан-та мед. наук. - М.,1990. 141 с.
3. Новикова Н.А., Анцупова А.С. // Вопр. вирусол. 1987. № 2. С. 238-241.
4. Almeida, J. D. // J. Gen. Virol. 1978. 40, 213-219.
5. Brandt, C. D. et al. // J.Clin. Microbiol. 1983. 18, 71-78.
6. Davidson, G. P., et al. // Lancet 1975. i: 242-245.
7. Kalica, A. R. et al. // Virology 1978. 87, 247-255.
8. Geyer, A., et al. // J.S.Afr. Vet. Assoc. 1996. 67 (3), 115-116.

Spisok literature

1. Drozdov S.G. i dr. Rotavirusnaya infekciya. M.1989, 32 s.
2. Kolpakov S.A. Avtoref. dis. ...kan-ta med. nauk. - M.,1990. 141 s.
3. Novikova N.A., Ancupova A.S. // Vopr. virusol. 1987. № 2. S. 238-241.
4. Almeida, J. D. // J. Gen. Virol. 1978. 40, 213-219.
5. Brandt, C. D. et al. // J.Slin. Microbiol. 1983. 18, 71-78.
6. Davidson, G. P., et al. // Lancet 1975. i: 242-245.
7. Kalica, A. R. et al. // Virology1978. 87, 247-255.
8. Geyer, A., et al. // J.S.Afr. Vet. Assoc. 1996. 67 (3), 115-116.