

## ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА 1974-ВНИИВВиМ ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ И.Р. ИМАТДИНОВ, В.И. БАЛЫШЕВА, В.Н. ПОНОМАРЕВ, О.В. КАПУСТИНА

Возможность распространения лихорадки долины Рифт (ЛДР) в Азию и Европу в последние десятилетия вызывает серьезные опасения. На протяжении многих лет ведутся разработки вакцин против ЛДР в нескольких направлениях, включая получение аттенуированных вакцинных вариантов вируса, инактивированных и генно-инженерных вакцин. Высокая вредоносность возбудителя ЛДР поставила перед нами задачу создания достаточно иммуногенного средства специфической профилактики ЛДР и обеспечения безопасности его производства. Поэтому целью представляемой работы стало изучение молекулярно-биологических свойств аттенуированного вируса ЛДР штамм 1974-ВНИИВВиМ, в том числе поиск высокотехнологичных культуральных клеточных систем для культивирования вируса и определения его антигенного и иммуногенного родства с вирулентным штаммом Entebbe. Результаты исследований показали, что в перевиваемых культурах клеток почки сайги (ПС), почки зеленой мартышки (CV-1) и почки сирийского хомячка (ВНК-21/13) вирус накапливается в высоких титрах при инфекционной активности  $8,23 \pm 0,21 \text{ lg MLD}_{50}/\text{см}^3$  и антигенной активности в реакции пассивной геммагглютинации (РПГА) в разведениях 1:64-1:128. Нами отработаны параметры культивирования вируса роллерным методом в культуре клеток ПС: скорость вращения культуральных бутылок — 12-15 об/ч; доза заражения — 0,01-0,001  $\text{MLD}_{50}/\text{кл}$ ; pH 6,4-6,8 в первые 12 ч культивирования. Последующее поддержание pH в пределах 7,2-7,6 в течение 48-72 ч культивирования при 37 °С обеспечивает получение вирусного сырья с высокой инфекционной ( $8,5 \pm 0,2 \text{ lg MLD}_{50}/\text{см}^3$ ) и антигенной активностью: титр в РПГА — 1:128-1:256, при твердофазном иммуноферментном анализе (ТФ-ИФА) — 1:625-1:3125. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей трех участков S- и М-сегментов вирусного генома, выполненный по методу максимального правдоподобия на основе модели К. Tamura и М. Nei (1993), позволил установить высокую степень родства штамма 1974-ВНИИВВиМ с известными штаммами Smithburn (аттенуированный) и Entebbe (вирулентный), что дает основание выделить их в отдельный кластер. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих гликопротеины G<sub>n</sub> и G<sub>s</sub> и нуклеопротеин N, показал, что большая часть замен в последовательностях указанных генов у штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР синонимичны и не приводят к изменению первичных аминокислотных последовательностей, вставки и делеции отсутствуют. В нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин G<sub>n</sub> штамма 1974-ВНИИВВиМ, нами выявлены восемь замен относительно аналогичной последовательности М-сегмента генома у вирулентного штамма Entebbe и 14 замен при сравнении с М-сегментом у штамма Smithburn. У штамма 1974-ВНИИВВиМ по сравнению с другими аттенуированными штаммами установлено низкое число значимых аминокислотных замен в антигенных компонентах вируса ЛДР, что подтверждает обоснованность выбора штамма 1974-ВНИИВВиМ в качестве источника генов иммунодоминантных белков и сырья для производства вакцин.

**Ключевые слова:** лихорадка долины Рифт, культивирование вируса, антигенность, иммуногенность, электронная микроскопия, филогенетический анализ.

Лихорадка долины Рифт (ЛДР) — зооантропонозное трансмиссивное остро протекающее заболевание с признаками интоксикации, лихорадки, некротического гепатита, геморрагического гастроэнтерита, с высокой летальностью среди ягнят и козлят. Возбудитель — вирус ЛДР (Rift Valley fever virus — RVFV) относят к семейству *Bunyaviridae* рода *Phlebotellus*. В настоящее время ЛДР привлекает пристальное внимание исследователей, так как считается особо опасным зооантропонозом и наносит огромный экономический ущерб, который складывается из потерь от абортов, высокого процента гибели молодняка, резкого снижения продуктивности скота, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, а также на госпитализацию и лечение людей (1).

Проявление болезни в виде эпизоотических вспышек и эпизоотий имеет место в африканских и азиатских странах. Однако согласно резуль-

татам исследований, проведенных Союзом защиты дикой природы (Wildlife Conservation Society), глобальное потепление повлечет изменение экосистем, привычных для определенных климатических поясов, на другие. В частности, следствием потепления может стать распространение и увеличение численности потенциальных переносчиков возбудителя ЛДР — комаров *Culex tritaeniorhynchus* и *Aedes vexans arabiensis*. Все это свидетельствует об угрозе распространения лихорадки долины Рифт в страны, которые до настоящего времени были свободны от этой болезни (2-4). В последние десятилетия вызывает серьезные опасения возможность распространения ЛДР в Азию и Европу (5-7).

На протяжении многих лет идут разработки вакцин против ЛДР в нескольких направлениях, в том числе получение аттенуированных вакцинных вариантов (8-11), инактивированных цельновирионных и субъединичных вакцин (12-14), вакцин на основе вирусных векторов, а также ДНК-вакцин (15-22). В России лихорадка долины Рифт изучается в числе других особо опасных инфекций животных и человека, в частности разрабатываются методы диагностики, средства специфической профилактики и меры борьбы (23). Методом серийных пассажей на мышках-сосунках во Всероссийском НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии получен аттенуированный штамм вируса ЛДР 1974-ВНИИВВиМ. Предложены отечественные тест-системы для выявления этого вируса на основе ПЦР с обратной транскрипцией и иммуноферментного анализа (24, 25).

На сегодняшний день в эндемичных зонах в ветеринарной практике применяют живые вакцины против ЛДР из аттенуированного штамма Smithburn, обладающего остаточной вирулентностью, что может привести к абортам или оказать тератогенное действие на плод. При этом, согласно сообщениям исследователей, новые кандидатные вакцины из аттенуированных вариантов (MP-12, Clone 13 и др.) могут иметь те же недостатки (5, 11). Для гуманитарной медицины разработана инактивированная вакцина, которую используют в экспериментальных целях, однако пока что она не зарегистрирована и отсутствует в продаже (14).

Известно, что производство живых и инактивированных вакцин связано с получением большого количества вирусного сырья с высокой инфекционной и иммуногенной активностью. В настоящей работе мы впервые показали, что в перевиваемых культурах клеток почки сайги, почки зеленой мартышки и почки сирийского хомячка штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса ЛДР накапливается в высоких титрах, имеет достаточно высокую инфекционную и антигенную активность. Установленная высокая степень родства штамма 1974-ВНИИВВиМ с известными штаммами Smithburn и Entebbe, а также низкое число значимых аминокислотных замен в его антигенных компонентах указывают на возможность использования штамма 1974-ВНИИВВиМ в качестве источника генов иммунодоминантных белков и сырья для производства вакцин.

Целью нашей работы стал поиск высокотехнологичных культуральных клеточных систем для репродукции аттенуированного штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт и изучение его молекулярно-биологических свойств, в частности определение антигенного и иммуногенного родства с референтными штаммами — вирулентным (Entebbe) и аттенуированным (Smithburn).

**Методика.** Аттенуированный штамм 1974-ВНИИВВиМ с инфекционной активностью  $6,0-6,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (50 % тканевая цитопатическая доза) был получен из коллекции микроорганизмов Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ). В работе использовали перевиваемые линии клеток почек сирийского хомячка (ВНК-

21/13), теленка (МДВК), сайги (ПС), зеленой мартышки (CV-1), сибирского горного козерога (ПСГК-60), эмбриона африканской козы (ПЭ-АК), а также первичную культуру клеток почки ягненка (ПЯ) для сравнения эффективности накопления вируса ЛДР в перевиваемых и первичных культурах клеток. Все культуры клеток получали из музея клеточных штаммов ВНИИВВиМ. При культивировании клеток применяли питательные среды Игла MEM (Minimum Essential Medium Eagle, «Sigma», США) и 0,25 % ФГМ-супензионную (ферментативный гидролизат мышц) (ВНИИВВиМ), обогащенную витаминами группы В и L-глутамином (600 мг/дм<sup>3</sup>) с добавлением 5-10 % сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) («Биолот», Россия). Из культуральных сосудов (матрасы объемом 1,5 л) с выросшим монослоем клеток удаляли ростовую среду и вносили поддерживающую среду с 2 % сыворотки. Множественность заражения составляла 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Инфицированную культуру инкубировали до 80-100 % ЦПД (цитопатическое действие). Для каждой культуры клеток проводили от трех до пяти последовательных пассажей.

Вирус размножали при 37 °С в статических условиях, в роллерных и супензионных культурах в течение 3-4 сут в зависимости от клеточного субстрата, множественности заражения и режима культивирования. Использовали коммерческие роллерные установки стелажно-ярусного типа («NBS», США), установки, разработанные и изготовленные во ВНИИВВиМ для промышленного культивирования клеток и вирусов (позволяют работать в режимах монослойного и супензионного культивирования), а также лабораторные ферментеры («NBS», США; «Biostat», ФРГ; «Chemar», Швейцария).

Инфекционную активность вируса определяли по общепринятым методикам — титрованием в культурах клеток CV-1, ПС или ПСГК-60 в 96-луночных планшетах либо на 1-3-суточных белых мышцах с живой массой 18-20 г при интрацеребральном заражении. Титр вируса рассчитывали по Риду и Менчу в модификации Ашмарина, выражая в lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> или lg MLD<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (50 % мышьяная летальная доза) (26). Антигенную активность вирусосодержащего материала определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) и «сендвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ-ИФА) соответственно с эритроцитарным антигеном и «Набором диагностических препаратов для ТФ-ИФА при ЛДР» (ВНИИВВиМ).

При молекулярно-биологических исследованиях использовали созданную нами ранее плазмидную библиотеку полноразмерных генов, кодирующих иммунодоминантные вирусные белки штамма 1974-ВНИИВВиМ (27), их нуклеотидные последовательности, полученные после секвенирования соответствующих плазмид и депонированные нами в GenBank (для гликопротеинов G<sub>n</sub> и G<sub>c</sub> — KF876008 и KF876009, для нуклеопротеина N — KF876010), а также другие нуклеотидные последовательности, которые к настоящему времени определены у вирулентных и аттенуированных штаммов и изолятов вируса ЛДР, — Entebbe (GenBank DQ380156.1), Smithburn (GenBank DQ380157.1), ZH548 (GenBank DQ380151.1), MP-12 (GenBank DQ380154.1), Kenya 9800523 (GenBank DQ380169.1). Эволюционный и филогенетический анализы выполняли в программе MEGA v. 6.06 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>) по методу максимального правдоподобия на основе модели К. Tamura и М. Nei (28). Первоначальные дендрограммы для последующего эвристического поиска получали с применением алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ.

Электронную микроскопию проводили на JEM-100S Electron Microscope («Jeol», Япония) с негативным контрастированием ультратонких срезов (29).

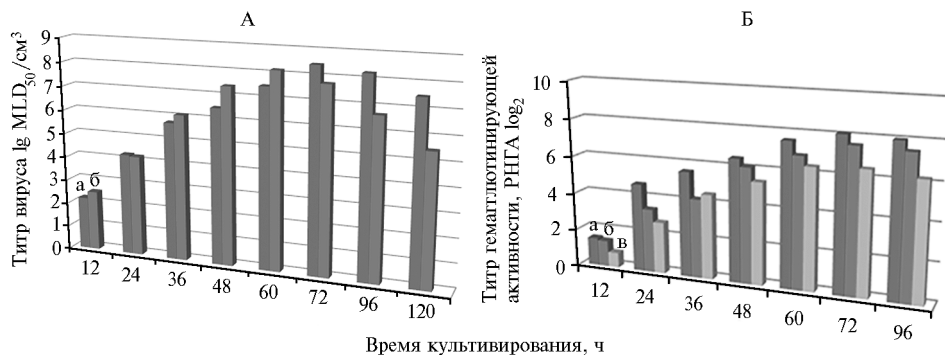
Статистический анализ по Г.Ф. Лакину (30) выполняли с использованием программ R 3.1.1 и Microsoft Office Excel 2013.

**Результаты.** Зависимость накопления штамма 1974-ВНИИВВиМ от множественности заражения (в диапазоне от 0,01 до 0,000001 ТЦД<sub>50</sub>/кл.), концентрации сыворотки КРС в поддерживающей среде (0 %, 2 % и 5 %), рН (6,4-7,6 с шагом 0,2), длительности культивирования при стационарном методе выращивания изучали в монослойных культурах клеток всех использованных линий. Наряду с клетками ПЯ, высокой вируспродуцирующей активностью обладали линии ПС, CV-1, ВНК-21/13, тогда как в культурах клеток ПЭАК, MDBK и ПСГК-60 титры вируса оказались на 0,4-0,9 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> ниже (табл.).

**Чувствительность культур клеток к штамму 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт (Rift Valley fever virus) при разном числе пассажей в стационарных условиях**

Число пассажей	Культура клеток	Время развития 80-100 % ЦПД	Титр инфекционной активности ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> (X±x)
7	ВНК-21/13	3-4	6,50±0,15
9	ПС	4	6,90±0,14
5	CV-1	3-4	6,50±0,25
4	ПСГК-60	3-4	6,22±0,17
5	ПЯ	3	6,32±0,14
5	ПЭАК	3-4	5,70±0,21
5	MDBK	3-5	6,00±0,25

Примечание. Перевиваемые (ВНК-21/13, ПС, CV-1, ПСГК-60, ПЭАК, MDBK) и первичная (ПЯ) культуры клеток почки: сирийского хомячка, сайги, зеленой мартышки, сибирского горного козерога, эмбриона африканской козы, теленка и ягненка (получены из музея клеточных штаммов Всероссийского НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии).



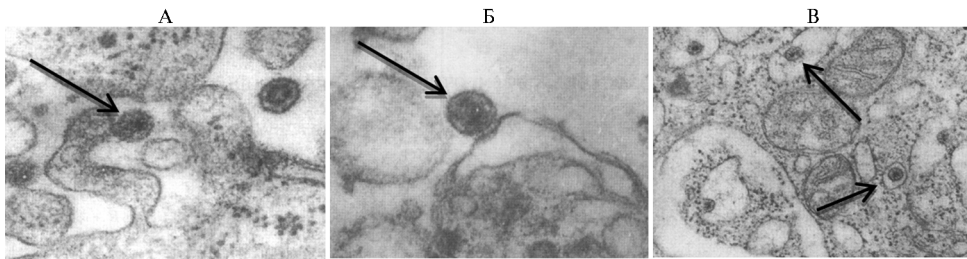
**Рис. 1.** Динамика инфекционной и антигенной активности штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт (Rift Valley fever virus) при размножении в культуре клеток почки сайги (ПС) (А) и почки сирийского хомячка (ВНК-21/13) (Б) роллерным (а), стационарным (б) и суспензионным (в) способами. MLD — мышьяная летальная доза. Приведенные результаты определения инфекционной активности были получены методом титрования, антигенной активности — в реакции пассивной геммагглютинации.

Вирус накапливался в перевиваемых культурах клеток ПС, CV-1, ВНК-21/13 в высоких титрах с инфекционной активностью 8,23±0,21 lg MLD<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, 6,50-6,90 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и антигенной активностью в РПГА в разведении 1:64-1:128. При роллерном методе в клетках ПС в варианте со скоростью вращения культуральных бутылей (объем 3 дм<sup>3</sup>) 12-15 об/ч, температурой культивирования 37 °С, дозой заражения 0,01-0,001 MLD<sub>50</sub>/кл., рН 6,4-6,8 в первые 12 ч культивирования и затем 7,2-7,6 в течение 48-72 ч достигалось получение вирусного сырья с высокой инфекционной (8,50±0,20 lg MLD<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и антигенной активностью (в РПГА — 1:128-1:256, в ТФ-ИФА — 1:625-1:3125) (рис. 1).

Установлено, что в культуре клеток ПС инфекционная и геммагглютинирующая активность вируса на 4-е сут была значительно выше, чем в

других клеточных культурах. Титр гемагглютинирующей активности, полученный в круговом монослое, в РПГА достигал величины 1:512.

Таким образом, роллерный способ культивирования обеспечивал максимальную антигенную активность вируса (см. рис. 1).



**Рис. 2.** Ранние стадии взаимодействия штамма 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт (Rift Valley fever virus) с чувствительными клетками (60-90 мин при 4 °С): А — плотный контакт вириона с клеточным отростком (увеличение  $\times 80000$ ), Б — утолщение и инвагинация плазмалеммы в области контакта с вирионом (увеличение  $\times 80000$ ), В — вирионы во внутриклеточных вакуолях (увеличение  $\times 40000$ ) (отмечено стрелками). Микроскоп JEM-100S Electron Microscope («Jeol», Япония). Снимки предоставлены М.А. Малаховой.

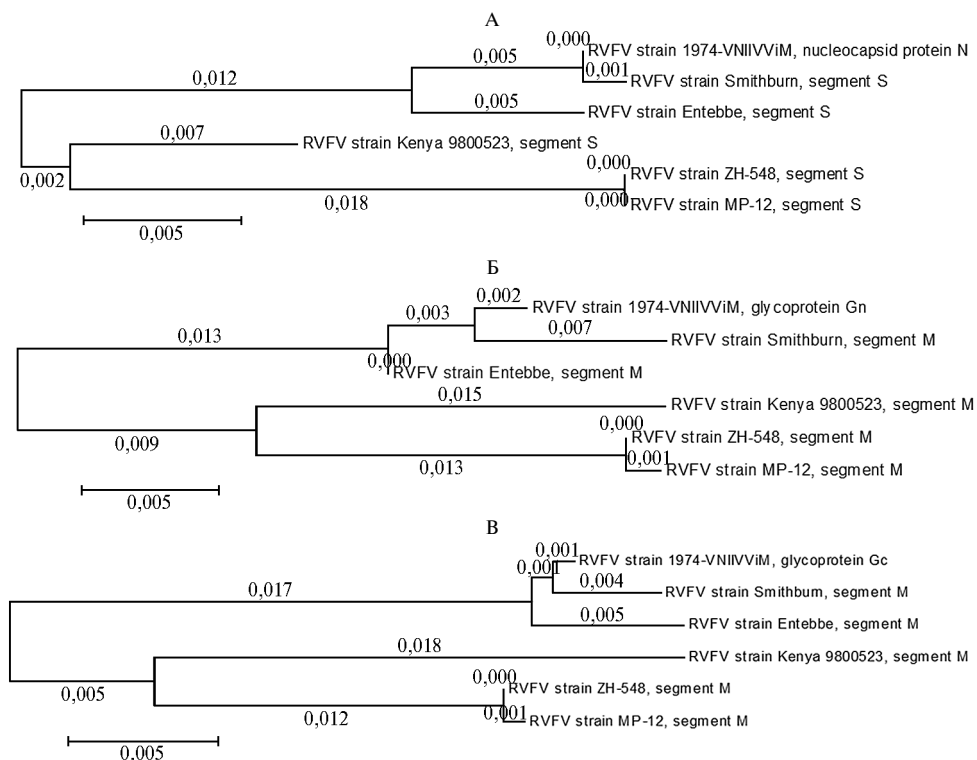
При электронно-микроскопических исследованиях инфицированных клеточных культур было показано, что в области контакта вирусных частиц с клетками клеточная мембрана утолщается и прогибается (рис. 2). Уже через 10 мин адсорбции при 37 °С происходило частичное слияние клеточной мембраны с оболочкой вируса. Также в период адсорбции вирусные частицы обнаруживались во внутриклеточных вакуолях. Установлено, что большинство чувствительных клеток инфицировались в период адсорбции вируса.

Молекулярно-биологическая характеристика строилась на сравнении и филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей генов и первичной структуры основных иммунодоминантных белков (гликопротеины Gn, Gc и нуклеопротеин N) у штамма 1974-ВНИИВВиМ и ряда вирулентных и вакцинных штаммов вируса ЛДР. Изучили три протяженных участка двух сегментов генома — полной нуклеотидной последовательности гена нуклеопротеина N размером 738 п.н. (S-сегмент, с 917-й по 1654-ю п.н.), последовательности, кодирующей гликопротеин Gn размером 1602 п.н. (M-сегмент, с 485-й по 2087-ю п.н.), и последовательности гена гликопротеина Gc длиной 1404 п.н. (M-сегмент, с 2090-й по 3494-ю п.н.).

Проведенный филогенетический анализ выявил высокую степень родства штамма 1974-ВНИИВВиМ со штаммами Smithburn и Entebbe (более 90 %), позволяя выделить их в отдельный кластер (рис. 3).

По результатам филогенетического анализа было принято решение провести детальное сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей соответственно генов и белков Gn, Gc и N у штаммов 1974-ВНИИВВиМ, Smithburn и Entebbe для определения их антигенного родства. Большинство нуклеотидных замен у штамма 1974-ВНИИВВиМ оказались синонимичными и не приводили к изменению первичной структуры белков, вставки и делеции отсутствовали. По всем трем анализируемым участкам штамм 1974-ВНИИВВиМ был близок к штаммам Smithburn и Entebbe. Так, в нуклеотидной последовательности гена N S-сегмента при сравнении с вирулентным штаммом Entebbe выявили восемь замен, с аттенуированным штаммом Smithburn — одну. Нуклеотидные замены приводили к аминокислотным замещениям в нуклеопротеине N, которые были полностью аналогичны таковым у штамма Smithburn относительно штамма Entebbe:  $Lys_{43} \rightarrow Arg_{43}$ ,  $Lys_{187} \rightarrow Arg_{187}$ ,  $Ser_{207} \rightarrow Asn_{207}$ ,  $Glu_{216} \rightarrow Gly_{216}$ ,  $Arg_{219} \rightarrow Lys_{219}$ . Большинство аминокислотных замен оказались свойственны и другим

представленным в GenBank штаммам и изолятам. Вероятно, они не критичны и не влияют на репродукцию вируса.



**Рис. 3.** Дендрограммы, отражающие филогенетическое родство штамма 1974-ВНИИВВиМ и других изолятов вируса лихорадки долины Рифт (Rift Valley fever virus), по данным анализа нуклеотидных последовательностей, кодирующих нуклеопротеин N (А), гликопротеин Gn (Б) и гликопротеин Gc (В) (метод максимального правдоподобия). Масштабные линейки отражают генетические дистанции.

В нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин Gn у штамма 1974-ВНИИВВиМ, имелось восемь замен относительно аналогичной последовательности М-сегмента у вирулентного штамма Entebbe и 14 — относительно М-сегмента у штамма Smithburn. По данным литературы (31), именно гликопротеин Gn содержит эпитопы, индуцирующие образование вируснейтрализующих антител, следовательно, нуклеотидные замены могут оказаться критическими как для вирулентности, так и для иммуногенности. В молекуле Gn у штамма 1974-ВНИИВВиМ были обнаружены следующие замены относительно соответствующей последовательности полипептидного предшественника, кодируемого М-сегментом генома у вирулентного штамма Entebbe: Asp<sub>75</sub>→Asn<sub>75</sub>, Tyr<sub>120</sub>→His<sub>120</sub>, Lys<sub>240</sub>→Asn<sub>240</sub>, Val<sub>302</sub>→Ile<sub>302</sub>, Leu<sub>428</sub>→Phe<sub>428</sub>, Ala<sub>441</sub>→Val<sub>441</sub>, Val<sub>462</sub>→Ile<sub>462</sub>. Отметим, что значимая замена Tyr<sub>120</sub> (полярная, незаряженная аминокислота)→His<sub>120</sub> (полярная, положительная заряженная аминокислота) произошла в одном из эпитопов (VKSPPKYGLTEDCN), индуцирующих образование вируснейтрализующих антител.

В последовательности, кодирующей гликопротеин слияния Gc, у штамма 1974-ВНИИВВиМ относительно аналогичного участка М-сегмента у вирулентного штамма Entebbe выявили девять замен, у аттенуированного Smithburn — пять (без изменений в потенциальных сайтах гликозилирования). При сравнении первичной структуры Gc у штаммов 1974-ВНИИВВиМ, Entebbe и Smithburn обнаружили единичную значимую за-

мену Asp<sub>412</sub>→Asn<sub>412</sub> (отрицательный заряд Asp может повлиять на конформацию белка и, как следствие, на вирулентность и иммуногенность).

Таким образом, сравнительный и филогенетический анализы позволили установить филогенетическое и антигенное родство штамма 1974-ВНИИВВиМ со штаммами Smithburn и Entebbe вируса ЛДР. Высокая степень гомологии исследованных генов, вероятно, связана с географией исходных вирусных изолятов (Африка, Уганда) и схожими методами аттенуации (серийное пассирование в головном мозге мышей). Сходство первичных аминокислотных последовательностей иммунодоминантных белков у штаммов 1974-ВНИИВВиМ и Smithburn позволяет выделить значимые при аттенуации аминокислотные замены и косвенно указывает на схожий иммуногенный потенциал. Относительно более низкая вирулентность штамма 1974-ВНИИВВиМ предположительно объясняется возможным наличием делеций или значимых мутаций в нуклеотидных последовательностях, кодирующих неструктурные белки NSs и NSm. Установлено низкое по сравнению с другими аттенуированными штаммами число значимых аминокислотных замен в антигенных компонентах, следовательно, выбор штамма 1974-ВНИИВВиМ в качестве источника генов иммунодоминантных белков и сырья для производства вакцин обоснован.

Итак, установлено, что перевиваемая линия клеток почки сайги и роллерный способ культивирования наиболее технологичны и обеспечивают получение сырья (штамм 1974-ВНИИВВиМ вируса лихорадки долины Рифт) с высокой инфекционной ( $8,23 \pm 0,21 \text{ lg MLD}_{50}/\text{cm}^3$ ) и гемагглютинирующей (титр в реакции пассивной гемагглютинации 1:512) активностью. Оптимальные условия культивирования вируса следующие: множественность заражения 0,0-0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл; концентрация сыворотки крупного рогатого скота в поддерживающей среде 2 %, pH 7,0-7,2; длительность культивирования 72-96 ч. Изучены три протяженных участка двух сегментов генома — полной нуклеотидной последовательности гена нуклеопротеина N размером 738 п.н. (S-сегмент, с 917-й по 1654-ю п.н.), последовательности, кодирующей гликопротеин Gn размером 1602 п.н. (M-сегмент, с 485-й по 2087-ю п.н.), и последовательности гена гликопротеина Gc длиной 1404 п.н. (M-сегмент, с 2090-й по 3494-ю п.н.), а также выполнено сравнение аминокислотных последовательностей трех этих гликопротеинов, важных для проявления антигенных, иммуногенных свойств и репродукции вируса. В результате установлено филогенетическое и антигенное родство штамма 1974-ВНИИВВиМ со штаммами Smithburn (аттенуированный) и Entebbe (вирулентный). Высокая степень гомологии исследованных генов, вероятно, связана с географией исходных вирусных изолятов (Африка, Уганда) и похожими методами аттенуации (серийное пассирование в головном мозге мышей). Полученные данные свидетельствуют, что штамм 1974-ВНИИВВиМ может использоваться в качестве источника генов иммунодоминантных белков и сырья для производства вакцин.

*ФГБНУ Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии,*  
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,  
e-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru, ilnazicf@ya.ru, balyvi@uandex.ru

*Поступила в редакцию  
27 июля 2015 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 6, pp. 794-802*

## **MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS, AND CULTIVATION OF AN ATTENUATED STRAIN 1974-VNIIVViM OF RIFT VALLEY FEVER VIRUS**

*I.R. Imatdinov, V.I. Balysheva, V.N. Ponomarev, O.V. Kapustina*

## Abstract

In recent decades, a threat of spreading Rift Valley fever (RVF) to Asia and Europe raises serious concerns. Within many years, vaccines against RVF were developed in several ways including designing attenuated vaccine versions, inactivated or genetically engineered vaccines. A serious hazard of the RVF agent requires developing sufficiently immunogenic preparations providing both RVF specific prevention and safety precautions in production procedures. Therefore, this work was aimed at molecular and biological characterization of an attenuated RVF virus (RVFV) strain 1974-VNIIVViM including search for high-tech cell culture systems for the virus growth and determination of its antigenic and/or immunogenic relationship with a virulent strain Entebbe. The results of the investigations showed that the virus accumulated in continuous cell cultures like saiga kidney (SK), Siberian mountain goat kidney (PSGK-60) and MDVK (calve kidney cell culture) at high titers with infectious ( $8.53 \pm 0.21 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{cm}^3$ ) and antigenic (1:64 to 1:128 in the passive hemagglutination test, PHT) activity levels. We determined optimal regime of the virus growth in BHK-21/13 (Syrian hamster kidney cell culture) using a roller culture method: the culture bottle rotation speed of 12 to 15 r.p.h.; the infection dosage of 0.01 to 0.001  $\text{MLD}_{50}/\text{cell}$ ; the first 12 hours of the culture at  $\text{pH} = 6.4$  to  $6.8$ . Further,  $\text{pH}$  is maintained at  $7.2$  to  $7.6$  for 48 to 72 hours of culture at  $37^\circ\text{C}$ , which provides the raw virus production at high infectivity ( $8.5$  to  $8.9 \pm 0.2 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{cm}^3$ ) and antigenicity (1:128 to 1:256 in PHT and 1:625 to 1:3125 in solid phase ELISA) levels. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of 3 sites in S and/or M segments showed that it was closely related to strains Smithburn and Entebbe allowing their grouping into a separate cluster. Comparative analysis of nucleotide sequences of genes encoding glycoproteins Gn and Gc, and the nucleoprotein N, shows that most of the substitutions in the sequences of the genes of the RVFV strain 1974-VNIIVViM are synonymous and do not alter the primary amino acid sequence, with insertion and deletion missing. In the nucleotide sequence encoding glycoprotein Gn of strain 1974-VNIIVViM we found 8 substitutions relative to a similar sequence of M segment of a virulent strain Entebbe, and 14 substitutions when compared with M segment of strain Smithburn. A lower (as compared with other attenuated strains) amount of significant amino acid substitutions in RVFV antigenic components was revealed; thus, strain 1974-VNIIVViM selection as a source of immunodominant proteins and/or raw virus for vaccine production seems to be well-grounded.

Keywords: Rift Valley fever, viral culture, antigenicity, immunogenicity, electron microscopy, phylogenetic analysis.

## REFERENCES

1. Bird B.H., Githinji J.W.K., Macharia J.M., Kasiiti J.L., Muriithi R.M., Gacheru S.G., Musaa J.O., Towner J.S., Reeder S.A., Oliver J.B., Stevens T.M., Erickson B.R., Morgan L.T., Khristova M.L., Hartman A.L., Comer J.A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Multiple virus lineages sharing recent common ancestry were associated with a large Rift Valley fever outbreak among livestock in Kenya during 2006–2007. *J. Virol.*, 2008, 82(22): 11152–11166 (doi: 10.1128/JVI.01519-08).
2. Knize A.V., Dmitrenko N.V., Strizhakov A.A. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Veterinarnye i meditsinskie aspekty zooantropozoonozov»* [Proc. Int. Conf. «Zoo anthroozoonoses: aspects of the veterinary and human medicine». Part 1]. Pokrov, 2003, chast' 1: 93–98.
3. *The deadly dozen: 12 diseases global warming incubates. From Lyme disease to Ebola virus, the world is getting sicker.* 2008 [Elektronnyi resurs]. (<http://preview.www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-warming-47100803>).
4. Chevalier V., Pépin M., Plée L., Lancelot R. Rift Valley fever — a threat for Europe? *Euro Surveill.*, 2010, 15(10): pii=19506 (IT-resource) (<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19506>) (PMID: 20403309).
5. Cito F., Narcisi V., Danzetta M.L., Iannetti S., Sabatino D.D., Bruno R., Carvelli A., Atzeni M., Sauro F., Calistri P. Analysis of surveillance systems in place in European Mediterranean countries for West Nile virus (WNV) and Rift Valley fever (RVF). *Transboundary and Emerging Diseases*, 2013, 60(2): 40–44 (doi: 10.1111/tbed.12124).
6. Shope R.E., Peters C.J., Davies F.G. The spread of Rift Valley fever and approaches to its control. *Bulletin of the World Health Organization*, 1982, 60(3): 299–304.
7. Bird B.H., Ksiazek T.G., Nichol S.T., MacLachlan N.J. Rift Valley fever virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2009, 234(7): 883–893 (doi: 10.2460/javma.234.7.883).
8. Rossi C.A., Turell M.J. Characterization of attenuated strains of Rift Valley fever virus. *J. Gen. Virol.*, 1988, 69: 817–823 (doi: 10.1099/0022-1317-69-4-817).



9. Murakami S., Terasaki K., Ramirez S.I., Morrill J.C., Makino S. Development of a novel, single-cycle replicable Rift Valley fever vaccine. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2014, 8(3): e2746 (doi: 10.1371/journal.pntd.0002746).
10. Grandadam M. Rift Valley fever virus. In: *Manual of security sensitive microbes and toxins*. CRC Press, Boca Raton, Florida, SSHA, 2014: 201-209 (ISBN: 9781466553965).
11. Pittman P.R. In: *Safety/immunogenicity/genetic drift of MP-12 Rift Valley fever vaccine (RVF MPI2)*. U.S. Army Medical Research and Materiel Command Report (CTI: NCT00415051) (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT00415051>).
12. Abd el-Rahim I.H., Abd el-Hakim U., Hussein M. An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1997. *Rev. Sci. Tech.*, 1999, 18(3): 741-748 (PMID: 10588018).
13. Scharin I. Seroprevalence of Rift Valley fever in sheep and goats in Zambezia, Mozambique and preparations for a metagenomic study of arboviruses in ticks. In: *Sveriges lantbruksuniversitet*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2014: 181-189 [Elektronnyi resurs] (<http://stud.epsilon.slu.se>).
14. Frank-Peterside N. Response of laboratory staff to vaccination with an inactivated Rift Valley fever vaccine — TSI-GSD 200. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2000, 29(2): 89-92 (PMID: 11379456).
15. Manuel A.F.V., Goncalves M.A., de Vries A.F. Adenovirus: from foe to friend. *Rev. Med. Virol.*, 2006, 16: 167-186 (doi: 10.1002/rmv.494).
16. Holman D.H., Penn-Nicholson A., Wang D., Woraratanadharm J., Harr M.-K., Luo M., Maher E.M., Holbrook M.R., Dong J.Y. A complex adenovirus-vectored vaccine against Rift Valley fever virus protects mice against lethal infection in the presence of preexisting vector immunity. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, 16(11): 1624-1632 (doi: 10.1128/CVI.00182-09).
17. Xiao Y., Zeng Y., Alexander E., Mehta S., Joshi S.B., Buchman G.W., Volkin D.B., Middaugh R.C., Isaacs S.N. Adsorption of recombinant poxvirus L1-protein to aluminum hydroxide/CpG vaccine adjuvants enhances immune responses and protection of mice from vaccinia virus challenge. *Vaccine*, 2013, 31(2): 319-326 (doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.007).
18. Soi R.K., Rurangirwa F.R., McGuire T.C., Rwambo P.M., DeMartini J.C., Crawford T.B. Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep Poxvirus with a recombinant Capripoxvirus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, 17(12): 1842-1849 (doi: 10.1128/CVI.00220-10).
19. Lorenzo G., Martin-Folgar R., Rodriguez F., Brun A. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep. *Vaccine*, 2008, 26: 5255-5262 (doi: 10.1016/j.vaccine.2008.07.042).
20. Bouloy M., Flick R. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res.*, 2009, 84: 101-118 (doi: 10.1016/j.antiviral.2009.08.002).
21. Spik K., Shurtleff A., McElroy A.K., Guttieri M.C., Hooper J.W., Schmaljohn C. Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus. *Vaccine*, 2006, 24: 4657-4666 (doi: 10.1016/j.vaccine.2005.08.034).
22. Lagerqvist N., Naslund J., Lundkvist A., Bouloy M., Ahlm C., Bucht G. Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley fever virus cDNA constructs. *Viol. J.*, 2009, 6(1): 6 (doi: 10.1186/1743-422X-6-6).
23. *Pyat'desyat let bor'by s osobo opasnymi boleznyami zhivotnykh* /Pod redaktsiei D.V. Kolbasova [50 years control of most dangerous animal diseases. D.V. Kolbasov (ed.).]. Vladimir, 2008: 54-55.
24. Belov A.B., Grebennikova T.V., Zaberezhnyi A.D., Butenko A.M., Aliper T.P. *Veterinariya*, 2007, 6: 53-55.
25. Sal'nikov N.G., Malogolovkin A.S., Kapustina O.V., Tsybanov S.Zh., Kolbasov D.V. *Materialy Mezhdunarodnoi konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika»* [Proc. Int. Conf. «Molecular diagnostics». V. 2]. Moscow, 2010, tom 2: 166-168.
26. Reed L.D., Muench H.A. Simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, 1938, 27: 493-497.
27. Imatdinov I.R., Kazakova A.S., Prilepskaya E.P., Balysheva V.I. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Aktual'nye voprosy kontrolya infektsionnykh boleznei zhivotnykh»* [Proc. Int. Conf. «Actual aspects of the infectious diseases control in animals»]. Pokrov, 2013: 154-160.
28. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, 10: 512-526.
29. Vrenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *BBA*, 1959, 34: 103-110.
30. Lakin G.F. *Biometriya* [Biometry]. Moscow, 1980.
31. Keegan K., Collett M.S. Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. *J. Virol.*, 1986, 58(2): 263-270.