

5. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л., Курчева С.А., Жарникова И.В., Гаркуша Ю.Ю., Жданова Е.В., Кальной С.М. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний. *Технологии живых систем*. 2017, 2: 52-58.
6. Тюменцева И.С., Курчева С.А., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Старцева О.Е., Гаркуша Ю.Ю., Семирчева А.А. Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы. *Военно-медицинский журнал*. 2018, 339 (5): 42-46.
7. Хаиров С.Г., Юсупов О.Ю., Яникова Э.А. Заявка № 2012101543/10, 17.01.2012. Способ получения эритроцитарного антигенового овисного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с целью индикации овисного антигена в биоматериале. Патент РФ № 2509306, 10.03.2014. Бюл. № 7.
8. Gall D., Nielsen K., Forbes L. et al. Alidation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in bison. *J. Wildl. Dis.* 2000, 36 (3): 76-469.
9. Pohanka M., Skladal B. Piezoelectric Immunosensor for the Direct and Rapid Detection of *Francisella tularensis*. *Folia Microbiol.* 2007, 52 (4): 325-330.
10. Sting R., Ortmann G. Erfahrungen mit einfachen ELISA-Testsystemes für die Brucellose — Serologie bei Rind, Schaf und Ziege. Berlin. *Und munch. Wochenschr* 2000, 113 (1): 22-28.

Поступила 27.11.18

Контактная информация: Жарникова Ирина Викторовна,
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Г.М.Игнатьев^{1,2}, Е.В.Отрашевская¹, Л.Л.Суханова¹, Е.С.Сидоренко¹, Н.А.Нетесова³

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ШТАММА RA-27/3, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КРАСНУХИ

¹НПО «Микроген», Москва; ²Федеральный НЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова, Москва; ³ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», пос. Кольцово, Новосибирская область

Цель. Целью данной работы было изучение генетической стабильности производственного штамма RA-27/3 вируса краснухи, используемого для производства вакцины НПО «Микроген». *Материалы и методы.* В исследовании были использованы серии производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи НПО «Микроген», готовые серии вакцин краснухи различных производителей и штамм «Орлов» вируса краснухи. Молекулярно-генетическое исследование штаммов проведено с использованием ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и секвенированием. *Результаты.* Получены полногеномные последовательности производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи, используемого НПО «Микроген» для производства вакцины. Последовательность вакцинного штамма представлена в GenBank. Показано полное соответствие штамма RA-27/3, используемого НПО «Микроген», аналогичному штамму, используемому GSK и Merck&Co. Inc. Штамм RA-27/3 вируса краснухи, применяемый НПО «Микроген», генетически стабилен. Полученные данные позволили продемонстрировать возможность использования метода ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией для подтверждения подлинности вакцинного штамма RA-27/3 вируса краснухи в готовых формах вакцин, как монокомпонентных так и трехкомпонентных. *Заключение.* Результаты проведенного исследования позволяют предположить возможность применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности изученных штаммов не только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцин.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 38—46

Ключевые слова: вирус краснухи штамм RA-27/3, генетическая стабильность, метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

MOLECULAR-GENETIC STUDY OF THE RA-27/3 STRAIN USED FOR PRODUCTION OF RUBELLA VACCINE

¹Scientific and Production Association for Immunobiological Preparations «Microgen», Moscow; ²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immunobiological Products, Moscow; ³State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, Russian

Aim. In order to study rubella virus strain RA-27/3 genetic stability, used for the vaccines production, a molecular genetic study was conducted. *Materials and methods.* In the study different series of master and work seed of RA-27/3 rubella virus strain by «Microgen», a few lots of rubella vaccines by the different manufacturers, as well as strain «Orlov» of rubella virus were used. RT-PCR followed by restriction, sequencing were performed. *Results.* Full-genomic sequences of the rubella virus strain RA-27/3 by «Microgen», were obtained and presented to GenBank. The full structure correspondence of RA-27/3 rubella virus strain by «Microgen» to the similar rubella strains used by GSK and Merck & Co Inc. has been shown. The RT-PCR method with the subsequent restriction was fulfilled using only domestic reagents. The developed method has been demonstrated as applicable for the identification of the RA-27/3 rubella virus strain as in mono-preparation as well as in the combined vaccine preparation. *Conclusion.* The data obtained make it possible to suggest application of the molecular genetic methods for the vaccine virus identification not only at the production stages, but also in the finished vaccine lots.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 38–46

Key words: rubella virus strain RA-27/3, genetic stability, restriction fragment length polymorphism

ВВЕДЕНИЕ

Краснуха является контагиозным заболеванием средней тяжести и характеризуется невысоким подъемом температуры, кореподобной сыпью и лимфоаденопатией. Вирус краснухи, вызывающий данное заболевание, относится к роду Rubivirus семейства Togaviridae [7,14]. По нуклеотидной последовательности вирус краснухи разделен на две клады, включающие в себя 13 генотипов. К первой кладе относятся 10 генотипов (1a-1J), ко второй кладе — три (2A-2C). Генотипирование вируса краснухи проводится по нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК области кодирующей белок оболочки E1 (позиция референсной последовательности генома: 8731-9469) длиной не менее 739 п.н [7, 14].

Эффективным средством профилактики заболевания является вакцинация. Для ее проведения было разработано девять вакцин на основе аттенуированных штаммов вируса краснухи [12]. Пять вакцин разработаны и производятся в Японии с использованием штаммов Matsuba, Matsuura, TCRB19, TO-336, KRT [11-13]. В КНР используется штамм BRD-2 [16]. Штаммы HPV-77 и Cendehill использовались для производства вакцин в США [6, 12]. Штамм RA-27/3 используется многими производителями вакцины против краснухи, такими как, Merck & Co. Inc, GSK Biologicals, НПО «Микроген», Serum Institute of India (Индия), Institute of Immunology (Хорватия) [12,13,15]. Современные требования к производству вакцинных препаратов, содержащих живые вакцинные штаммы вирусов, предполагают контроль генетической стабильности производственных штаммов, в том числе, вируса краснухи, что рекомендовано ИСН и ГФ РФ XIII [1, 8]. Все производители, кроме Serum Institute of India (Индия) и Institute of Immunology (Хорватия), сделали доступной информацию о нуклеотидной структуре производственных штаммов RA-27/3 вируса краснухи и об их генетической стабильности [12, 15]. Наличие информации о нуклеотидной структуре штаммов позволяет применить молекулярно-генетические методы для контроля подлинности вакцинных штаммов, причем, не

только на этапах производства, но и в готовых сериях вакцины. Регламентированный ГФ РФ XIII метод определения подлинности производственного штамма вакцины против краснухи, также, как производственных штаммов вакцин паротитной и коревой, на самом деле, не позволяет подтвердить подлинность именно производственного штамма. Метод нейтрализации вируса специфической иммунной сывороткой позволяет только подтвердить принадлежность исследуемого вакцинного штамма вируса к роду и семейству. Для вирусов кори, паротита и краснухи описан высокий серологический перекрест между штаммами — т.е. иммунная сыворотка, полученная к вакцинному штамму обладает вируснейтрализующей активностью по отношению к другим штаммам семейства [3-5,9,10]. Ранее была продемонстрирована возможность использования метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (Restriction fragment length polymorphism — RFLP) для дифференциальной диагностики и подтверждения подлинности вакцинного штамма вируса паротита «Ленинград-3» (НПО «Микроген») [2].

Целью настоящей работы было исследование структуры производственного и посевного штамма RA-27/3 вируса краснухи, используемого НПО «Микроген» для производства моновалентной и трехкомпонентной вакцин, а также изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использован вирус краснухи штамм «Орлов» (генотип 2с), предоставленный СПб НИИ вакцин и сывороток. Штамм использовался в качестве контроля при проведении рестрикционного анализа вакцинных штаммов вируса краснухи.

В работе использованы вакцины следующих производителей: Serum Institute of India (SII) — вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (четыре серии), вакцина против краснухи живая аттенуированная (одна серия). GlaxoSmithKlein Biologicals (GSK) — «Приорикс» — вакцина против кори, паротита и краснухи живая аттенуированная (три серии). Merck&Co., Inc (Merck) — «ProQuad», вакцина против кори, паротита, краснухи и ветряной оспы (одна серия). НПО «Микроген»: вакцина против краснухи живая аттенуированная (3 серии), вакцина паротитная (штамм «Ленинград-3») (1 серия), вакцина против кори живая аттенуированная (штамм «Ленинград-16») (1 серия). Производственный штамм вируса краснухи RA-27/3 (серия №2), посевной вирус штамм RA-27/3 вируса краснухи (серии №3, 4). Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита «Вактивир» (серии M0015эк, M0020эк, M0021эк).

Для выделения РНК из образцов использовали набор «РИБО-сорб» («АмплиСенс», Россия). Все работы по выделению РНК проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору. Выделенная РНК находилась в объеме 50 мкл. Все эксперименты проводились с использованием ферментов и компонентов реакционных смесей производства НПО «СибЭнзим» (Россия).

Плазмида ДНК pUCRA27/1 (кат.№ D17). Плазмида содержит вставку фрагмента кДНК вируса краснухи, штамм RA-27/3, длиной 589 п.н., соответствующих позициям 3669-4538 п.н. в геноме вируса краснухи. Фрагмент имеет сайт рестрикции рестриктазой ZraI (или AatII), позволяющий получить фрагменты с длинами 251 п.н. и 338 п.н.

Получение кДНК из препаратов РНК. Реакционная смесь при проведении реакции обратной транскрипции в объеме 50 мкл содержала: ОТ-ПЦР-смесь — реакционный буфер, смесь дНТФ, 50мМ MgCl₂, специфические праймеры (кат.№ E317, № B309, №025) — 47,1 мкл; HS Taq полимераза (кат. №B309) — 0,4 мкл; M-MuLV ревертаза (кат.№E317) — 0,5мкл; РНК исследуемого образца — 2 мкл. Реакцию проводили в течение 30 мин при 45°С.

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК длиной 589 п.н. и их гидролиз эндонуклеазой рестрикции ZraI. После прохождения реакции обратной транскрипции проводилась ПЦР в тех же пробирках, поскольку все необходимые компоненты ПЦР уже содержались в растворах, а матрицей могла служить кДНК, наработанная с вирусной РНК. Термоциклирование проводили в следующем режиме: предварительный прогрев при 95°C — 3 мин, далее 35 циклов амплификации (95°C — 15 сек, 63°C — 20 сек, 68°C — 5 сек, 72°C — 40 сек). После прохождения ПЦР к 25 мкл полученной смеси добавляли 5 мкл буфера для рестрикции «ROSE» (кат.№B021) и 20 мкл воды, затем делили на две аликвоты по 25 мкл и к одной из них добавляли 1 мкл рестриктазы ZraI. После инкубации в течение 1 часа при 37°C пробы наносили на 1,5% агарозный гель и проводили электрофорез в 1xTAE-буфере.

Для определения полных последовательностей производственного штамма и посевного вируса штамма RA-27/3 (НПО «Микроген») были синтезированы праймеры, полностью перекрывающие последовательность генома вируса краснухи с шагом 500 п.н.

Секвенирование проводили на приборе Prism 310 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Анализ данных секвенирования проводили с использованием программы Chromas 2.22 (Techne-lysium Pty Ltd, Австралия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение первичной структуры полноразмерных геномов производственного штамма и посевного вируса штамма вируса краснухи RA-27/3 НПО «Микроген». Производственный штамм вируса краснухи RA-27/3 (серия №2) прошел 26 пассажей на культуре клеток WI-38 и три пассажа на клетках MRC-5. Посевной вирус штамм RA-27/3 (серия №3) прошел 26 пассажей на культуре клеток WI-38 и четыре пассажа на клетках MRC-5. Указанные серии были приготовлены в 2008 году. В 2012 году из производственного штамма (серия №2) была приготовлена серия №4 посевного вируса краснухи с тем же количеством пассажей, что и серия №3. В процессе производства вакцины посевной вирус проходит один пассаж на культуре клеток MRC-5. Пассажные истории штаммов RA-27/3, используемых GSK, Merck и НПО «Микроген», сопоставимы друг с другом [12, 15].

Результаты секвенирования кДНК производственного штамма (серия №2) представлены в GenBank (номер JF727653). Сравнительные результаты секвенирования кДНК посевного вируса (серии № 3 и 4) и кДНК штамма, полученной из готовой серии вакцины (номер в GenBank JF727654), приготовленной из серии №3 указанного посевного вируса, свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности идентичны последовательностям производственного штамма. Полученные результаты указывают на то, что штамм RA-27/3 НПО «Микроген» генетически стабилен на этапах производства вакцины. Сравнение полученных нуклеотидных последовательностей штамма RA-27/3 НПО «Микроген» с ранее опубликованным геномом штамма Wistar RA 27/3 Merck и GSK (GenBank FJ211587, FJ211588) продемонстрировало, что структурные последовательности штамма RA 27/3 НПО «Микроген» полностью идентичны штамму RA 27/3 указанных производителей [15].

Выбор фрагмента штамма краснухи RA-27/3, пригодного для подтверждения подлинности штамма методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Выбор фрагментов штамма RA-27/3 для дальнейшего использования RFLP осуществлялся по следующим критериям: А — анализ множественного выравнивания референсных последовательностей всех генотипов вируса, включая вакцинные штаммы; В — существование доступной отечественной эндонуклеазы рестрикции, узнающей сайт, содержащий нуклеотидную замену; С — отсутствие сайта узнавания подобран-

ной рестриктазы в окрестности выявленной замены, так как дополнительный сайт может затруднить выявление нужного фрагмента после гель-электрофореза; D — уникальность замены, что проверяется при помощи программы BLAST с учетом всех неполных последовательностей из геномов вируса краснухи, внесенных в базу данных GenBank.

Анализ структуры геномов штаммов вируса краснухи в области гена белка E1 (8731-9469 п.н.). Данный участок (739 п.н.) генома вируса краснухи используется для генотипирования, поэтому для него имеется наибольшее количество первичных структур, выложенных в GenBank. В настоящем исследовании было проведено множественное выравнивание референсных последовательностей всех 13 генотипов вируса краснухи с последовательностью штамма RA-27/3 НПО «Микроген». В результате анализа было обнаружено, что фрагмент гена белка E1 (8731-9469 п.н.) не содержит одиночных замен, присущих только штамму RA27/3, пригодных для использования в дифференциации методом RFLP. Надежная дифференциация штамма RA27/3 от других вакцинных и диких штаммов возможна только при использовании нескольких (не менее четырех) эндонуклеаз рестрикции для гидролиза ПЦР-продукта с участка 739 п.н. В связи с этим, был проведен анализ всех известных полных геномов вируса краснухи с целью выявить подходящие отличия последовательности штамма RA27/3 вне участка, используемого для определения генотипов.

Анализ первичной структуры полноразмерных геномов штаммов вируса краснухи, представленных в базе данных GenBank. Для проведения анализа были выбраны 44 полноразмерных последовательности геномов штаммов и изолятов вируса краснухи, которые включают представителей всех имеющихся генотипов, последовательности вакцинных штаммы японских и китайских производителей вакцины и последовательности штамма RA27/3 от Merck, GSK и НПО «Микроген». Множественное выравнивание позволило обнаружить несколько нуклеотидных замен, присущих только штамму RA27/3. В результате проведенного анализа были отобраны две специфические для штамма RA27/3 (НПО «Микроген», Merck и GSK) одонуклеотидные замены, наиболее пригодные для их дифференциации от остальных известных штаммов вируса краснухи. В позиции 2950 геном штамма RA-27/3 содержит замену C→T, что приводит к образованию сайта CATCC/GGATG узнавания эндонуклеаз рестрикции FokI и BstF5I, которые являются изошизомерами, узнающими одинаковую последовательность, но расщепляющие ДНК в разных позициях (гетерошизомеры). Таким образом, указанный сайт эндонуклеазы рестрикции могут быть использованы для проведения RFLP. В позиции 4220 геном штамма RA27/3 содержит замену A→G, что приводит к образованию сайта GACGTC узнавания эндонуклеаз рестрикции AatII и ZraI (гетерошизомеры по данному сайту). Из трех найденных вариантов дифференциации штамма RA27/3 преимуществом обладает последний вариант с использованием ПЦР-продукта участка, включающего в себя замену в позиции 4220 и одной из рестриктаз ZraI или AatII. Так как сайт GACGTC встречается реже сайта CATCC, это упрощает анализ продуктов гидролиза. Остальные два варианта как с использованием сайта CATCC в позиции 2950, так и с использованием нескольких эндонуклеаз рестрикции для расщепления ПЦР-продукта с участка 739 п.н. могут быть зарезервированы на будущее и применены в случае обнаружения диких изолятов вируса краснухи, не отличимых от штамма RA27/3 в тесте на присутствие сайта GACGTC в позиции 4220.

Выбор праймеров для амплификации выбранного участка генома с сайтом GACGTC в позиции 4220 и расчет длин фрагментов, образующихся при гидролизе ПЦР-продукта. Для амплификации фрагмента, содержащего сайт GACGTC, были подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать фрагмент 589 п.н. — microRUf 5' GGC

TGG CCC AGG CGT ACT ACG A 3' ; microRUr 5' CGG CCG TCC CAA AGG TTG CA 3' . В результате проведения ПЦР с использованием кДНК из штаммов вируса краснухи и данных праймеров должен образоваться ампликон длиной 589 п.н. Нуклеотидная последовательность этого фрагмента для штамма RA27/3 (варианты НПО «Микроген», Merck и GSK) приведена ниже.

GGCTGGCCCCAGGCGTACTACGACGACCTCGAGGTTGCGCCGCCTCGGGGATGACGCCATGGCCCCGGGCGGCCCTCGCATCAGTCCAACGCCCTCGCAAAGGCCCTTACAATATCAGGGTATGGAACATGGCCGCAGGCGCTGGCAAGAC CACCCGCATCCTCGCTGCCTTCACGCGCGAAGACSTTTACGTCTGCCCCACC AATGCGCTCCTGCACGAGATCCAGGCCAAACTCCGCGCGCGCGATATCGACG TCAAGAACGCCGCCACCTACGAGCGCGCGCTGACGAAACCGCTCGCCGCCTA CCGCCGCATCTACATCGATGAGGCGTTCACTCTCGGCGGCGAGTACTGCGCG TTCGTTGCCAGCCAAACCACCGCGGAGGTGATCTGCGTCGGTGATCGGGACC AGTGCGGCCACACTACGCCAATAACTGCCGCACCCCCGTCCCTGACCGCTG GCCTACCGAGCGCTCACGCCACACTTGGCGCTTCCCCGACTGCTGGGCGGC CCGCCTGCGCGCGGGGCTCGATTATGACATCGAGGGCGAGCGCACCGGCAC CTTCGCCTGCAACCTTTGGGACGGCCC

Расщепление этого фрагмента эндонуклеазой рестрикции ZraI (или AatII) приводит к образованию фрагментов с длиной 251 п.н. и 338 п.н. в случае использования в качестве матрицы кДНК штамма RA27/3 (НПО «Микроген», Merck и GSK). При расщеплении ампликонов, полученных в ПЦР с использованием кДНК от других штаммов вируса краснухи, фрагмент 589 п.н. будет иметь несколько отличающуюся структуру и не будет расщепляться ферментами ZraI и AatII. В качестве положительного контроля при проведении реакции возможно использование плазмиды ДНК pUCRA27/1 (НПО «СибЭнзим», Россия). Плазида содержит вставку фрагмента кДНК вируса краснухи, штамм RA-27/3, длиной 589 п.н., соответствующих позициям 3669-4538 п.н. в геноме вируса краснухи. Фрагмент имеет сайт рестрикции рестриктазой ZraI (или AatII), позволяющий получить фрагменты с длиной 251 п.н. и 338 п.н.

Результаты ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией рестриктазой ZraI в образцах, содержащих штаммы краснухи. Для выделения РНК и последующего проведения ОТ-ПЦР с рестрикцией использовали штаммы вируса краснухи и образцы готовых форм вакцины различных производителей, как описано в разделе Материалы и методы. Результат ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией производственного штамма RA-27/3 НПО «Микроген» представлен на рис. 1. При амплификации получен ампликон с предполагаемой расчетной длиной 589 п.н. При рестрикции полученного ампликона рестриктазой ZraI получены два фрагмента с расчетной длиной 251 п.н. и 338 п.н.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией штамма «Орлов» (генотип 2С) вируса краснухи ампликон расчетной длины получен, однако результат рестрикции — отрицательный. При рестрикции полученного ампликона рестриктазой ZraI фрагменты с расчетной длиной 251 п.н. и 338 п.н. не получены. Это связано с тем, что штамм краснухи «Орлов» не содержит сайт рестрикции ZraI в фрагменте генома с 3969 по 4538 н.о.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией производственного штамма, посевных серий вакцинного штамма и готовых серий вакцины против краснухи и комбинированной вакцины НПО «Микроген» была получена картина, аналогичная представленной на рис. 1. При проведении ОТ-ПЦР и последующей рестрикции всех серий вакцин против краснухи производства Serum Institute of India, GSK, Merck визуальный результат совпадал с полученным для штамма RA-27/3 НПО «Микроген» (рис. 2).

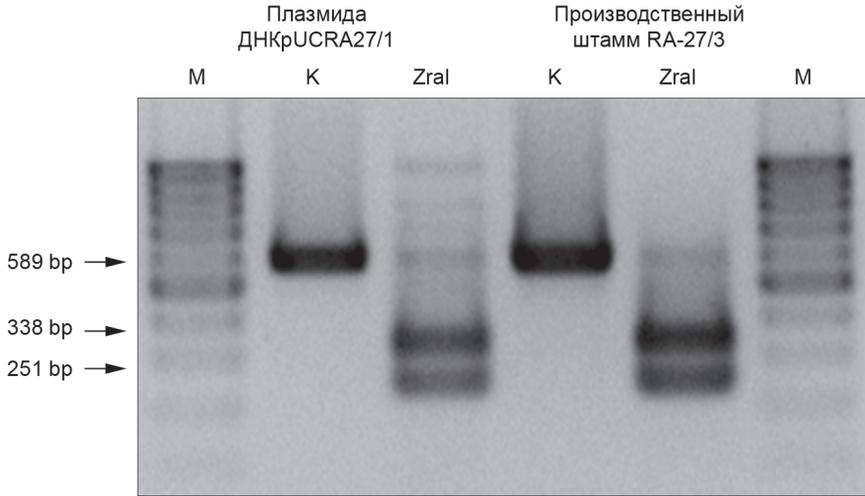


Рис. 1. Расщепление ПЦР-продуктов 589 п.н., амплифицированных из кДНК плазмиды и производственного штамма RA-27/3 НПО «Микроген».

M — маркер длины фрагментов 100 bp (НПО «СибЭнзим»); K — контрольные нерасщепленные продукты ПЦР; ZraI — продукты гидролиза ампликонов рестриктазой ZraI.

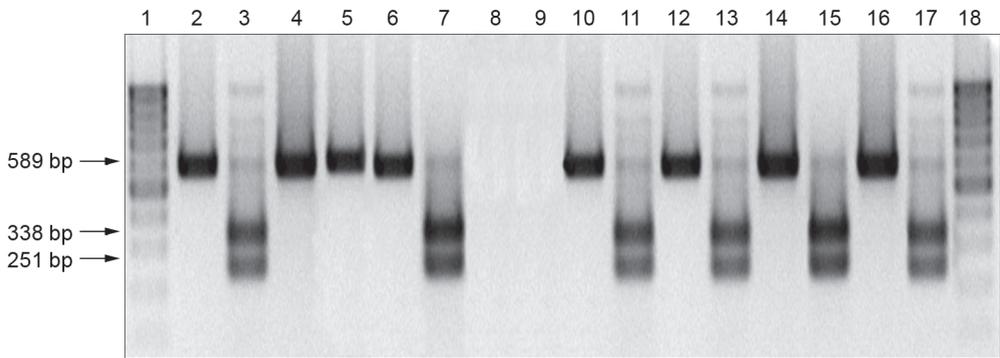


Рис. 2. Результаты ОТ-ПЦР и RFLP образцов вакцин различных производителей, содержащих и не содержащих штамм RA-27/3 вируса краснухи.

Дорожки 1, 18: M — маркер длин фрагментов 100 bp (НПО «СибЭнзим»); 2 — плазмида pUCRA27/1 (результат ОТ-ПЦР), 3 — RFLP ампликона плазмиды; 4 — ОТ-ПЦР штамма «Орлов», 5 — RFLP ампликона штамма «Орлов»; 6 — ОТ-ПЦР посевного штамма RA-27/3 НПО «Микроген»; 7 — RFLP ампликона посевного штамма RA-27/3 НПО «Микроген»; 8 — вакцина паротита; 9 — вакцина кори; 10 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи RA-27/3 НПО «Микроген»; 11 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи НПО «Микроген»; 12 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи Serum Institute of India; 13 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи Serum Institute of India; 14 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи GSK; 15 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи GSK; 16 — ОТ-ПЦР готовой серии вакцины краснухи Merck; 17 — RFLP ампликона готовой серии вакцины краснухи Merck.

При проведении ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией вакцин паротитной и против кори производства НПО «Микроген» фрагмент длиной 589 п.н. амплифицирован не был, т.е. результат был отрицательным.

Таким образом, выбранные праймеры позволяют провести ОТ-ПЦР всех РНК выделенных из образцов, содержащих вирус краснухи, и получить ампликон размером 589 п.н. (рис. 2). Только те фрагменты, которые содержат сайт рестрикции для

рестриктазы ZraI, характерный для штамма RA-27/3, при проведении рестрикции позволяют получить два фрагмента длиной 251 п.н. и 338 п.н.

Таким образом, предложенный для амплификации с последующей рестрикцией фрагмент штамма RA-27/3 позволяет подтвердить подлинность штамма не только на этапах производства, но и в готовой форме вакцины, независимо от производителя.

Исследование структуры гена белка протеиназы p150 штамма вируса краснухи RA-27/3 готовых серий вакцины различных производителей. Для штаммов вируса краснухи, используемых в Японии, показано, что изменение их биологических свойств в ходе аттенуации может быть связано с изменениями аминокислот в гене p150 [11]. Сравнение последовательностей гена p150 готовых серий краснушной вакцины НПО «Микроген», полученных при проведении данного исследования, продемонстрировало совпадение структур между собой и их гомологичность последовательностям штамма RA-27/3 GSK и Merck (по данным GenBank). Поскольку данные о последовательности штамма RA-27/3 SII в GenBank отсутствуют, было проведено изучение структуры гена p150 в готовых формах вакцин разных производителей — НПО «Микроген», GSK, Merck и SII. Результаты секвенирования гена p150 готовых серий НПО «Микроген», GSK и Merck продемонстрировали полное совпадение последовательностей между исследованными образцами и их гомологичность структурам, представленным указанными производителями для штамма RA-27/3 в GenBank. Для готовых серий SII выявлена замена в позиции 1691 — G→A. Данная замена приводит к изменению кодона GCG в кодон ACG и, соответственно, к изменению аминокислоты аланин (неполярная) в аминокислоту треонин (полярная). При расщеплении этого предшественника, аминокислотная замена аланин→треонин унаследует белком p150, содержащим протеазный домен и домен кэпирования. Эта замена не располагается в каком-либо из функциональных доменов белка p150 и, таким образом, ее роль в изменении структурных и биохимических характеристик белка p150 на данном этапе не ясна. Тем не менее, полученные результаты позволяют говорить о неполной гомологии штамма RA-27/3, используемого индийским производителем, со штаммом RA-27/3, используемым GSK, Merck и НПО «Микроген».

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрированы: генетическая стабильность штамма вируса краснухи RA-27/3, используемого НПО «Микроген» для производства вакцин как моно-, так и комбинированной вакцины; гомологичность этого штамма со штаммами RA-27/3, используемыми GSK и Merck; возможность использования метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для подтверждения подлинности вакцинного штамма в готовой форме вакцины против краснухи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея РФ XIV. ФС.3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая.
2. Кулак М.В., Белавин П.А., Нетесова Н.А., Юнасова Т.Н., Голикова Л.Н., Бектемиров Т.А., Игнатьев Г.М. Дифференциация вакцинного штамма Л-3 от других штаммов вируса паротита методом ОТ-ПЦР. Биопрепараты. 2008, 4: 7-11.
3. Отрашевская Е.В., Букин Е.К., Красильников И.В., Игнатьев Г.М. Специфический гуморальный иммунитет после однократной иммунизации паротитной вакциной: результаты трехлетнего наблюдения. Вопросы вирусологии. 2011, 56(3): 45-48.
4. Atrasheuskaya A.V., Kulak M.V., Neverov A.A. et al. Measles cases in highly vaccinated population of Novosibirsk, Russia, 2000-2005. Vaccine. 2008, 26(17): 2111-2118.
5. Charlton C.I., Lai F.Y., Dover D.C. How to determine protective immunity in the post-vaccine era. Human vaccines & immunotherapeutics. 2016, 12(4): 903-906.

6. Fogel A., Plotkin S.A. Markers of rubella virus strain in RK13 cell culture. *Journal of Virology*. 1969, 3(2): 157-163.
7. Hobman T., Chantler J. Rubella virus. *In: Knippe D.M., Howley P.M., Griffin D.E. et al. (editors). Fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins: 2007, p. 1069-1100.
8. ICH Guidance, Q5D: Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products (63 FR 50244; September 21, 1998).
9. Kanbayashi D., Kurata T., Takahashi K. et al. A novel cell-based high throughput assay to determine neutralizing antibody titers against circulating strains of rubella virus. *J. of Virological Methods*. 2018, 28: 86-93.
10. McLean H.Q., Fiebelkorn A.P., Ogee-Nwankwo A. et al. Rubella virus neutralizing antibody response after a third dose of measles-mumps-rubella vaccine in young adults. *Vaccine*. 2018, 36(38): 5732-5737.
11. Otsuki N., Abo H., Kubota T. et al. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. *Vaccine*. 2011, 29: 1863-1873.
12. Reef S.E., Plotkin S.A. Rubella vaccine. *In: Plotkin S., Orenstein W., Offit P. (editors). Vaccines*. Philadelphia, PA: Elsevier, 2013, p. 688-717.
13. Rubella vaccines. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2011, 86(29): 301-316.
14. Rubella virus nomenclature update. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2013, 88(32): 337-343.
15. Tillieux S.L., Halsey W.S., Sathe G.M. et al. Comparative analysis of the complete nucleotide sequences of measles, mumps, and rubella strain genomes contained in Priorix-Tetra and ProQuad live attenuated combined vaccines. *Vaccine*. 2009, 27(16): 2265-2273.
16. Xu H., Gao X., Bo F. et al. A rubella outbreak investigation and BRD-II strain rubella vaccine effectiveness study, Harbin city, Heilongjiang province, China, 2010 -2011. *Vaccine*. 2014, 32(1): 85-90.

Поступила 10.02.19

Контактная информация: Отрашевская Елена Викторовна,
115088, Москва, 1-я Дубровская ул., 15, р.т. (495)790-77-73

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Н.Ф.Василенко, Е.А.Манин, О.В.Малецкая, А.С.Вольнкина, Д.А.Прислегина, О.В.Семенко, А.Н.Куличенко

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИРОДНОГО ОЧАГА КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Ставропольский Научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Определить границы природного очага Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) в Российской Федерации на современном этапе, уточнить спектр основных резервуаров и переносчиков возбудителя КГЛ, оценить лоймопотенциал природного очага. *Материалы и методы.* Используются материалы эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга природного очага КГЛ, методы эпидемиологического и эпизоотологического анализа, молекулярно-генетический и картографический метод. Обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010. *Результаты.* Научно обоснована единая целостность полупустынно-степного природного очага КГЛ, занимающего на современном этапе обширную территорию юга европейской части России площадью 831 тыс. км². Четко прослеживается расширение ареала возбудителя КГЛ с вовлечением в эпидемический процесс новых административных районов, выраженная тенденция смещения границ очага в северном направлении. Отмечается рост лоймопотенциала природного очага. Основной резервуар и переносчик вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки — клещ *Nyalomma marginatum*. В природном очаге преобладающим генотипом является «Европа-1». *Заключение.* Необходимо совершенствовать тактику эпидемиологического надзора за КГЛ с применением современных научно-обоснованных подходов, одним