

УДК 615.371:601.4:577.2.08
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>

ШИФР СПЕЦИАЛЬНОСТЬ
03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)
03.01.07 Молекулярная генетика



Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой

Г. М. Игнатьев^{1*}, А. С. Оксанич², Л. П. Антонова¹, Т. Г. Самарцева², С. В. Мосолова¹, К. М. Мефед¹, Л. В. Гмыль¹, Н. А. Нетесова³

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследования и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», пос. Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1, поселение Московский, Москва, 108819, Российская Федерация

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Малый Казенный переулок, д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

³Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

Бешенство — острая вирусная инфекция, вызываемая вирусом семейства *Rhabdoviridae* рода *Lyssavirus* и характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы и абсолютной летальностью. Единственной возможностью предотвратить возникновение данного заболевания у людей является вакцинопрофилактика. Одним из препаратов, используемых в этих целях, является вакцина антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированная сухая, выпускаемая ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН». **Цель работы:** исследование структуры производственного, рабочего посевного вируса бешенства штамма Внуково-32, используемого ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» для производства антирабической вакцины, его генетической стабильности на этапах производства, изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины и изучение нуклеотидной последовательности штамма CVS. **Материалы и методы:** производственный штамм вируса бешенства Внуково-32, рабочие посевные вирусы, готовые серии вакцины антирабической, штамм CVS фиксированного вируса бешенства, используемый для оценки специфического иммунитета. Молекулярно-генетическое исследование проведено с использованием ОТ-ПЦР с последующей рестрикцией и секвенированием. **Результаты:** представлены результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена G, полученного из производственного штамма Внуково-32, серий рабочего посевного вируса и готовых серий вакцины антирабической, изготовленных в 2012, 2018, 2019 г., штамма фиксированного вируса бешенства CVS, используемого для оценки специфической активности вакцины. Показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины. **Заключение:** штаммы Внуково-32 и CVS, используемые в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», являются вирусами бешенства. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена G показал, что штамм Внуково-32 стабилен на разных этапах производства. Полученная нуклеотидная последовательность гена G штамма Внуково-32 депонирована в GenBank (номер MN116503). Показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 вируса бешенства на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Ключевые слова: бешенство; ген G; генетическая стабильность; штамм Внуково-32; антирабическая вакцина

Для цитирования: Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мосолова СВ, Мефед КМ, Гмыль ЛВ, Нетесова НА. Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020;20(2):107–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>

Контактное лицо: Игнатьев Георгий Михайлович; marburgman@mail.ru

Molecular Genetic Testing of Stability and Identification of Vnukovo-32 Strain Used for Production of the Cultural Concentrated Purified Inactivated Dry Rabies Vaccine

G. M. Ignatyev^{1,*}, A. S. Oksanich², L. P. Antonova¹, T. G. Samartseva², S. V. Mosolova¹, K. M. Mefed¹, L. V. Gmyl¹, N. A. Netesova³

¹Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 8/1 Township of the Poliomyelitis Institute, Moskovsky cluster, Moscow 108819, Russian Federation

²Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5a Maly Kazenny Lane, Moscow 105064, Russian Federation

³State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Oblast 630559, Russian Federation

Rabies is an acute viral disease caused by a virus of the *Rhabdoviridae* family of the *Lyssavirus* genus, which affects the central nervous system and is characterised by absolute mortality. Vaccination is the only way to prevent the disease in humans. One of the products used for vaccination is a cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine produced by the Federal State Budgetary Institution of Science "Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences" (hereinafter—Chumakov Center). **The aim of the study** was to examine the structure of the working virus seed of Vnukovo-32 strain used by the Chumakov Center for rabies vaccine production, to assess its genetic stability during production, to explore the possibility of using molecular genetic methods for identification of the production strain in the finished dosage form, and to study the nucleotide sequence of the CVS strain. **Materials and methods:** Vnukovo-32 rabies virus production strain, working virus seeds, finished batches of the rabies vaccine, CVS fixed rabies virus strain used in the assessment of specific immunity. The molecular genetic study was performed using RT-PCR followed by restriction and sequencing. **Results:** the paper presents the results of nucleotide sequence analysis of the G gene fragment obtained from the Vnukovo-32 production strain, batches of the working virus seed, and finished batches of the rabies vaccine produced in 2012, 2018, and 2019, and the CVS fixed rabies virus strain used in the assessment of the vaccine's specific immunity. The study demonstrated that restriction analysis could be used for Vnukovo-32 strain identification at all production stages, including the finished dosage form. **Conclusion:** Vnukovo-32 and CVS strains used by the Chumakov Center are rabies viruses. Analysis of the nucleotide sequence of the G gene fragment showed that the Vnukovo-32 strain remains stable throughout different production stages. The obtained nucleotide sequence of gene G of the Vnukovo-32 strain was deposited in GenBank (accession number MN116503). The study demonstrated that restriction analysis could be used for Vnukovo-32 strain identification at all production stages, including the finished dosage form.

Key words: rabies; gene G; genetic stability; Vnukovo-32 strain; rabies vaccine

For citation: Ignatyev GM, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mosolova SV, Mefed KM, Gmyl LV, Netesova NA. Molecular genetic testing of stability and identification of Vnukovo-32 strain used for production of the cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2020;20(2):107–115. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115>

*Corresponding author: Georgy M. Ignatyev; marburgman@mail.ru

Несмотря на повсеместное внедрение вакцин против бешенства в практику здравоохранения, во всем мире по-прежнему от вируса погибает около 55 тыс. человек в год. Основная смертность приходится на страны Африки и Азии, где чаще всего умирают дети до 15 лет [1]. Причина такой ситуации в этих регионах кроется в отсутствии вакцинации от бешенства бродячих собак, которые являются основным переносчиком вируса. В то же время в этих странах имеется дефицит препаратов, которые применяются для экстренной профилактики и лечения после укусов животных — таких как антирабический иммуноглобулин и вакцины, а также в доступности медицинской помощи в отдаленных от городов населенных пунктах.

В настоящее время проблеме профилактики и лечения бешенства ВОЗ уделяет огромное внимание. Усилия ученых направлены на разработку более эффективных вакцин, вызывающих стойкий и длительный иммунитет уже после первого введения, и на снижение стоимости таких препаратов. Разрабатывается ряд новых видов вакцин от бешенства с адьювантами второго поколения, такими как агонист толлоподобного рецептора-3 (aTLR-3), состоящий из синтетической дцРНК, кодирующей aTLR-3, и полиинозин-полицитидиловой

кислоты, стабилизированной канамицином и кальцием [2]. Рекомбинантные вакцины, состоящие из рекомбинантного гликопротеина вируса бешенства, получаемого в эукариотических системах экспрессии белка, разрабатываются в Индии [3]. Применяют также генетическую модификацию вируса бешенства для создания живых аттенуированных вакцин, используя удаление генов, кодирующих фосфопротеин [4] или матриксный белок [5], что приводит к отсутствию инфекции даже у иммунокомпromетированных мышей. Другой пример генетически модифицированного вируса — это введение в геном вируса второй нуклеотидной последовательности, кодирующей гликопротеин. Такой вирус имел более высокую патогенность по сравнению с диким вирусом, но после инактивации вызывал у мышей и собак более сильный и быстрый иммунный ответ после однократного введения, чем та же доза инактивированного дикого исходного вируса [6]. Среди вакцин для профилактики бешенства у человека и животных можно выделить генетические (ДНК или РНК) вакцины, которые применяются как в чистом виде, так и в форме вирусных или бактериальных векторов [3]. Особое внимание в проводимых работах уделяется генетической стабильности применяемых вакцинных штаммов

Таблица 1. Виды вируса бешенства, включенные в род *Lyssavirus*, их первичные хозяева, распространение и соответствие филогруппам [8–10]

Table 1. Types of rabies viruses covered by the *Lyssavirus* genus, their primary hosts, habitats, and philogroups [8–10]

Принятые и предполагаемые виды Established and assumed species	Выявленный первичный хозяин Confirmed primary host	Регион распространения Habitat	Филогруппа Philogroup
<i>Rabies virus</i> (RABV)	Хищники и летучие мыши Predators and bats	Везде, кроме Австралии и некоторых островов; летучие мыши — только в Америке Everywhere except Australia and some islands; bats—only in America	I
<i>Duvenhage virus</i> (DUVV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Eptesicus serotinus</i>) Insectivorous bats (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Африка (суб-Сахара) Africa (sub-Saharan)	
<i>European bat lyssavirus, type 1</i> (EBLV-1)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Eptesicus serotinus</i>) Insectivorous bats (<i>Eptesicus serotinus</i>)	Большая часть Европы (от Испании до Украины) Most of Europe (from Spain to Ukraine)	
<i>European bat lyssavirus, type 2</i> (EBLV-2)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. dasycneme</i>) Insectivorous bats (<i>Myotis daubentonii</i> , <i>M. dasycneme</i>)	Северо-Западная Европа Northwest Europe	
<i>Australian bat lyssavirus</i> (ABLV)	Летучие мыши (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>) Bats (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>)	Австралия Australia	
<i>Irkut virus</i> (IRKV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Murina leucogaster</i>) Insectivorous bats (<i>Murina leucogaster</i>)	Восточная Азия Eastern Asia	
<i>Khujand virus</i> (KHUV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis mystacinus</i>) Insectivorous bats (<i>Myotis mystacinus</i>)	Центральная Азия Central Asia	
<i>Aravan virus</i> (ARAV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis blythi</i>) Insectivorous bats (<i>Myotis blythi</i>)	Центральная Азия Central Asia	
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i> (BBLV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Myotis nattereri</i>) Insectivorous bats (<i>Myotis nattereri</i>)	Франция, Германия France, Germany	
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i> (GBLV)	Индийские летучие лисы (<i>Pteropus medius</i>) Indian flying foxes (<i>Pteropus medius</i>)	Шри-Ланка Sri Lanka	
<i>Lagos bat virus</i> (LBV)	Летучие мыши (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>) Bats (<i>Pteropus</i> spp., <i>Saccolaimus albiventris</i>)	Африка (суб-Сахара) Africa (sub-Saharan)	II
<i>Mokola virus</i> (MOKV)	Неизвестен Unknown	Африка (суб-Сахара) Africa (sub-Saharan)	
<i>Shimoni bat virus</i> (SHIBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Hipposideros commersoni</i>) Insectivorous bats (<i>Hipposideros commersoni</i>)	Кения Kenya	
<i>West Caucasian bat virus</i> (WCBV)	Насекомоядные летучие мыши (<i>Miniopterus</i> spp.) Insectivorous bats (<i>Miniopterus</i> spp.)	Юго-Восточная Европа South-Eastern Europe	Не определена Not determined
<i>Ikoma lyssavirus</i> (IKOV)	Неизвестен Unknown	Танзания Tanzania	
<i>Lleida bat lyssavirus</i> (LLEBV)	Обыкновенный длиннокрыл (<i>Miniopterus schreibersii</i>) Bent-winged bat (<i>Miniopterus schreibersii</i>)	Испания, Франция Spain, France	
<i>Kotalahti bat lyssavirus</i> (KBLV)	Ночница Брандта (<i>Myotis brandtii</i>) Brandt's bat (<i>Myotis brandtii</i>)	Финляндия Finland	Не имеет таксономического статуса No taxonomic status
<i>Taiwan bat lyssavirus</i> (TWBLV)	Восточный нетопырь (<i>Pipistrellus abramus</i>) Japanese house bat (<i>Pipistrellus abramus</i>)	Тайвань Taiwan	Не имеет таксономического статуса No taxonomic status

вируса (генетических конструкций) в процессе их размножения (репликации) и длительного культивирования.

Вирус бешенства относится к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса представляет собой несегментированную одноцепочечную РНК отрицательной полярности длиной около 12 тыс. нуклеотидов, кодирующую пять белков: нуклеопротеин (N), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) [3].

Род *Lyssavirus* содержит 16 видов вируса бешенства, 13 из которых распределены по 2 филогруппам (табл. 1). Кроме того, выделены два изолята вируса бешенства, которые на момент подготовки статьи не имеют таксономического статуса — *Taiwan bat lyssavirus* (TWBLV) [7] и *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV) [8]. Первый обнаружен у двух восточных нетопырей (*Pipistrellus abramus*) в Тайване, второй — у ночницы Брандта (*Myotis brandtii*) в Финляндии. Все вирусы бешенства исходно были обнаружены у летучих мышей за исключением *Mokola lyssavirus* (MOKV) и *Ikoma lyssavirus* (IKOV), первичные хозяева которых пока не выявлены.

Подавляющее большинство случаев заболевания бешенством как человека, так и животных вызывается вирусами, относящимися к виду *Rabies virus* (RABV). Вирусы остальных видов либо обнаруживались лишь эпизодически у больных людей и наземных животных, либо найдены только у летучих мышей. Штаммы вирусов — SAD-Bern, SAD-B19, ERA, SAG, SAG2, Flury, Pitman Mooge, — используемые для производства вакцин, также относятся к виду *Rabies virus* (RABV) [11].

Как и для других РНК-вирусов, геному вируса бешенства свойственна высокая эволюционная изменчивость. Это связано с тем, что вирусная РНК-полимераза не обладает корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью, что приводит к повышенному уровню возникновения нуклеотидных замен при репликации вирусного генома. Небольшие различия в нуклеотидных последовательностях отдельных представителей одного штамма могут быть обнаружены как для вирусов, выделенных из одного зараженного организма, так и выделенных из одного образца вакцины [11]. Частота возникновения спонтанных однонуклеотидных замен в случае вируса бешенства особенно высока в последовательности гена G ($21,9 \times 10^{-4}$ мутаций на основание). Для сравнения, в последовательности гена N эта частота значительно ниже — $(2,9-3,7) \times 10^{-4}$. Вероятно, повышенный уровень изменчивости гена G, кодирующего основной антиген, важен для вируса бешенства, помогая ему быстрее адаптироваться к различным хозяевам [12]. Таким образом, последовательность гена белка гликопротеина является высоковариабельной и может использоваться для контроля генетической стабильности. Кроме этого, белок гликопротеина содержит иммуногенные эпитопы, которые обеспечивают формирование иммунитета [13]. Нуклеотидная структура данных эпитопов известна [14], поэтому контроль генетической стабильности одновременно позволяет контролировать стабильность (сохранность, наличие) иммуногенных эпитопов.

Цель работы — исследование структуры производственного, рабочего посевного вируса бешенства штамма Внуково-32, используемого ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН» для производства антирабической вакцины, его генети-

ческой стабильности на этапах производства, изучение возможности применения молекулярно-генетических методов для подтверждения подлинности производственного штамма в готовой форме вакцины и изучение нуклеотидной последовательности штамма CVS.

Материалы и методы

В исследовании были использованы производственный штамм Внуково-32, рабочие посевные вирусы № 26 и 28 (с разным количеством пассажей) и готовые серии вакцины антирабической 521, 962, 018 (серии были приготовлены в 2012, 2018, 2019 г.), штамм фиксированного вируса бешенства CVS, используемый для оценки специфической активности. Выделение вирусной РНК из указанных образцов, структура праймеров, использованных для реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР), проведение реакции обратной транскрипции (ОТ), ПЦР описаны в приведенных ниже пунктах 1–4 соответственно. Анализ каждого из образцов проводился в трех повторях.

1. Подбор праймеров

Для определения вариабельных и консервативных участков генома вируса бешенства был проведен анализ первичной структуры полноразмерных последовательностей штаммов вирусов бешенства, представленных в GenBank. Это позволило произвести выбор нуклеотидных маркеров для подтверждения подлинности вакцинного штамма Внуково-32. На основании полученных данных проведен выбор области для амплификации и подбор праймеров. Расчеты проводили с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen Corporation). Структура использованных в работе праймеров и их характеристика приведены в таблице 2.

При компьютерном анализе последовательности подобранных олигонуклеотидов они не образовывали стабильных вторичных структур в виде шпилек и термодинамически стабильных гомо- и гетеродимеров. Синтез праймеров был проведен в компании Синтол (Россия).

2. Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Из 100 мкл препарата, содержащего штамм вируса бешенства Внуково-32 или штамм фиксированного вируса бешенства CVS, с помощью комплекта реагентов «МАГНО-сорб» (Ампли-Сенс®, ИнтерЛабСервис) выделяли РНК согласно инструкции производителя.

Для получения кДНК с использованием праймера RabF (табл. 2) и набора реагентов для ОТ (Синтол, Россия) на матрице вирусной РНК проводили реакцию ОТ. На первом этапе смешивали 2 мкл праймера RabF (10 пкмоль/мкл) с 6 мкл выделенной РНК и прогревали смесь при 95 °С 5 мин. Далее охлаждали пробирки при комнатной температуре 2 мин и добавляли 22 мкл смеси для ОТ (9 мкл деионизированной воды, 12 мкл 2,5-кратного буферного раствора для ОТ, 1 мкл MMLV-ревертазы) и инкубировали при 42 °С 30 мин. Для инактивации ревертазы смесь прогревали при 95 °С в течение 5 мин.

ПЦР на кДНК, полученной после ОТ, проводили в объеме 25 мкл с использованием праймеров RabF и RabR. ПЦР-смесь получали смешиванием по 1 мкл праймеров RabF

Таблица 2. Структура праймеров
 Table 2. Primer structure

Праймер Primer	Структура Structure	Длина, п.н. Length, bp	Расчетная температура отжига, °С Estimated annealing temperature, °C
RabF	5' GG TAGTGGAGGACGAAGGATGC 3'	22	58,4
RabR	5' CGCAAGTCTCACTCCCTTTGGA 3'	22	60,1

GGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTCCTACATGGAACCTAAAGTTGGATACATCTTAGCCA
TAAAAATGAACGGGTTTCACCTTGACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAAACCTACACTAACTTCGTTGGTTATGTCACA
ACCAGGTTCAAAAGAAAGCATTTCCGGCCAAACACCAGATGCATGTAGAGCGCGGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTG
ACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCTGACTAC**AGCTG**GCTTGAACCTGTA AAAACCACCAAGGAG
TCTCTCGTTATCATATCTCCAAGTGT**AGC**AGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCSTAGC
GGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACACGATTACACCATTTGGATGCCCGAGAA
TCCGAGACTAGGGAAGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAGAGAGCAT**CCAAAGGGAGTGAGACTTGGC**

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность штамма Внуково-32. Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства. CAGCTG сайт рестрикции *PvuII*.

Fig. 1. The nucleotide sequence of the Vnukovo-32 strain. The fragment corresponds to positions 3458–3996 of the rabies virus genome. *PvuII* restriction site, CAGCTG.

(10 пкмоль/мкл), RabR (10 пкмоль/мкл), 10 мкл универсальной 2,5-кратной реакционной смеси для ПЦР (Синтол, Россия) и 8 мкл деионизированной воды с последующим добавлением 5 мкл кДНК. Амплификацию проводили по следующей программе: 95 °C — 1 мин 30 с; 40 циклов: 95 °C — 20 с, 55 °C — 15 с, 72 °C — 45 с; финальная элонгация 72 °C — 10 мин.

3. Секвенирование

Секвенирование ПЦР-продуктов с расчетной длиной 539 п.н. проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer 3500 (ABI, США) с использованием праймеров, использовавшихся для амплификации. Последовательность каждого фрагмента была расшифрована с прямого и обратного праймера, полученные первичные структуры проверены на отсутствие разночтений и полиморфизмов и объединены в программе Vector NTI 9.1 с помощью функции Contig Assembler.

4. Проведение ПДРФ¹

В реакцию рестрикции брали по 5 мкл смеси ПЦР после амплификации. Реакцию проводили эндонуклеазой рестрикции *PvuII* (ООО «СибЭнзим», Россия) в объеме 20 мкл в течение 1 ч согласно инструкции производителя. Продукты гидролиза разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и визуализировали в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена G из представленных образцов

Штамм Внуково-32. В результате исследования при амплификации РНК, выделенной из всех указанных образцов, включающих производственный штамм, рабочие посевные вирусы (№ 26, 28), готовые серии вакцины, были получены фрагменты с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность фрагментов всех образцов была идентична и представлена на рисунке 1.

Результаты секвенирования кДНК производственного штамма Внуково-32 представлены в GenBank (номер MN116503). В результате проведенного множественного выравнивания фрагментов гена G вируса бешенства штамма Внуково-32 (производственный штамм, рабочий посевной вирус, готовые серии вакцины) и ряда известных вакцинных штаммов (ERA, ERA-VC, SAG-2, SAD-B19, SAD-Bern) было показано отсутствие отличий в нуклеотидной последовательности штамма Внуково-32, полученной как из производственного штамма, рабочего посевного вируса, так и из готовых серий вакцины, выпущенных в разные годы. Это позволяет предполагать генетическую стабильность штамма Внуково-32, как минимум по изучаемому фрагменту, на разных этапах производства вакцины.

На основании полученных данных была составлена таблица 3, отображающая выявленные нуклеотидные различия в штаммах вируса бешенства (группа SAD).

Проведенный анализ показывает, что вакцинный штамм Внуково-32, используемый для производства, отличается от близких к нему штаммов, что позволяет проводить его идентификацию, исходя из нуклеотидного состава выбранной части генома. Анализ последовательностей штамма Внуково-32 и других вакцинных штаммов показал, что ген белка G штамма Внуково-32 содержит сайт рестрикции *PvuII* — CAGCTG. ДНК других штаммов не имеют такого сайта. В связи с этим появляется возможность подтверждения подлинности штамма Внуково-32 на всех этапах производства и в готовой форме вакцины с использованием молекулярно-генетических методов. Использование указанной рестриктазы позволяет гидролизовать амплифицированный фрагмент 539 п.н. с образованием двух фрагментов 276 и 263 п.н. В случае использования ПЦР-продукта, полученного на кДНК штамма Внуково-32, в агарозном геле результат гидролиза будет выглядеть одной выраженной полосой. В случае других штаммов (в нашем случае штамм CVS) реакция не пройдет, и фрагмент останется той же длины — 539 п.н. Результаты проведенного ПДРФ-анализа представлены на рисунке 2. При проведении гидролиза рестриктазой *PvuII* ПЦР-продукта, полученного на кДНК штамма CVS, в связи с отсутствием указанного сайта рестрикции у данного штамма реакция не прошла, в то время как у образцов, полученных на кДНК штамма Внуково-32, отмечается расщепление амплифицированного фрагмента с образованием 2 фрагментов примерно равной длины, в результате чего они визуализируются в виде одной полосы в районе 260–270 п.н.

Штамм CVS. В результате исследования при амплификации РНК, выделенной из 10% мозговой суспензии штамма фиксированного вируса бешенства CVS, получен фрагмент с расчетной длиной 539 п.н. Нуклеотидная последовательность штамма CVS представлена на рисунке 3.

Анализ нуклеотидной последовательности фиксированного вируса бешенства штамма CVS свидетельствует о том, что она полностью гомологична нуклеотидным последовательностям штаммов CVS, представленных в открытом доступе в GenBank. В базе данных GenBank представлены последовательности штаммов CVS, используемых разными исследовательскими группами.

По своей нуклеотидной последовательности штамм CVS вируса бешенства, используемый в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» для контроля специфической активности, гомологичен последовательностям штаммов CVS, используемых в мире, и не содержит сайт рестрикции *PvuII*, характерный для штамма Внуково-32.

¹ ПДРФ — полиморфизм длин рестрикторных фрагментов.

Таблица 3. Различающиеся нуклеотиды в изучаемом фрагменте гена G штамма Внуково-32, других вакцинных производных штаммов SAD и референсного штамма вируса бешенства RABV ref

Table 3. Differing nucleotides in the studied G gene fragment of the Vnukovo-32 strain, other vaccine derivatives of the SAD strain, and the RABV ref rabies virus reference strain

Штамм / Позиция в геноме Strain / Position in the genome	Vnuk 32	РПВ	ГСВ	ERA	ERA-VC	SAG-2	SAD-B19	SAD-Bern	RABV ref
3528	C	C	C	T	T	T	T	T	C
3539	A	A	A	A	A	G	G	A	A
3731	A	A	A	C	C	C	C	C	C
3732	G	G	G	G	G	G	G	G	A
3795	T	T	T	A	A	A	A	A	A
3839	A	A	A	A	A	A	A	A	G
3847	G	G	G	G	G	G	G	G	T
3918	A	A	A	A	A	A	A	G	A
3932	A	A	A	A	A	A	A	G	A
Число отличий от Vnuk 32 Number of differences from the Vnukovo-32 strain	—	—	—	3	3	4	4	5	5

Примечание. Серым фоном выделены нуклеотиды, отличающиеся от таковых в последовательности Внуково-32; позиции нуклеотидов даны по геномной последовательности референсного штамма вируса бешенства (RABV ref GenBank NC 001542). Vnuk 32 — производственный штамм Внуково-32 (GenBank MN116503); РПВ — рабочий посевной вирус; ГСВ — готовые серии вакцины антирабической 521, 962, 018.

«—» отличия не выявлены.

Note. Nucleotides that differ from those in the Vnukovo-32 sequence are highlighted in grey; nucleotide positions are given according to the genomic sequence of the rabies virus reference strain (RABV ref GenBank NC 001542). Vnuk32—production strain Vnukovo-32 (GenBank MN116503); РПВ—working virus seed; ГСВ—finished batches of the rabies vaccine 521, 962, 018.

— no differences identified.

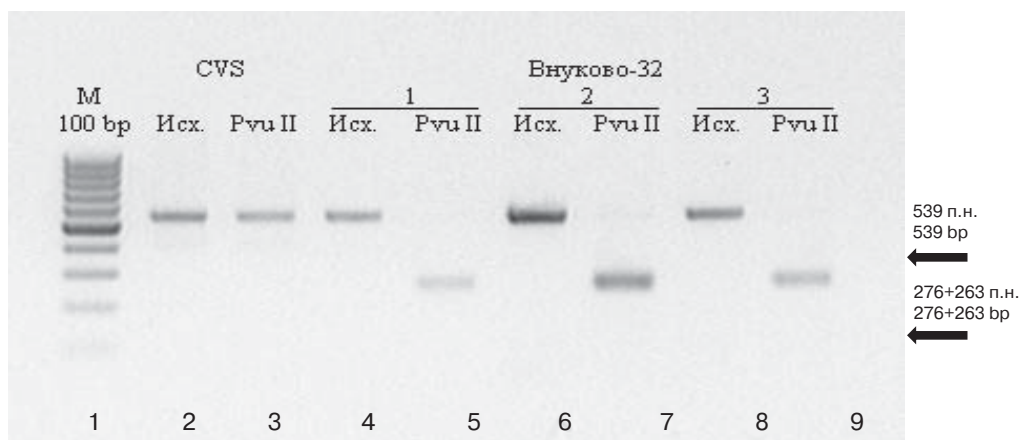


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов гидролиза рестриктазой *PvuII* ампликонов фрагмента гена G, полученных из различных образцов штаммов вируса бешенства. Дорожка 1 — М, маркер длин фрагментов ДНК (SE 100bp, НПО «СибЭнзим», М15); дорожки 2, 3 — штамм CVS: 2 — продукт амплификации до рестрикции *PvuII*, 3 — результат гидролиза *PvuII*; дорожки 4–9 — штамм Внуково-32; дорожки 4–5 — производственный штамм; 6–7 — серия вакцины 561; 8–9 — серия вакцины 962; 4, 6 и 8 — продукты амплификации до рестрикции *PvuII*; 5, 7 и 9 — результаты гидролиза *PvuII*.

Fig. 2. Electropherogram of the products of *PvuII* hydrolysis of the G gene fragment amplicons obtained from different samples of rabies virus strains. Lane 1—M, marker of DNA fragment length (SE 100 bp, Research, Development and Production Facility "SibEnzyme", M15); Lanes 2, 3—CVS strain: 2—amplification product before *PvuII* restriction, 3—result of hydrolysis by *PvuII*; Lanes 4–9—Vnukovo-32 strain; Lanes 4–5—production strain; Lanes 6–7—vaccine batch 561; Lanes 8–9—vaccine batch 962; Lanes 4, 6, and 8—amplification product before *PvuII* restriction; Lanes 5, 7, and 9—results of hydrolysis by *PvuII*.

GGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCCGAGTTCTCCTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAAC-
 GGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACAGAGCCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGTCACAACCACATTC AAGAGAAAGCATTT
 CCGCCSSACSSCAGACGCATGTAGAGCCGCTATAACTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCC
 CGACTACCACTGGCTTCGAAGTGAAGAACCACCAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCAAGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAA
 ATCCCTTCACTCAAAGGTCTTCCCTGGCGGAAAATGCTCAGGAATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCATGATTACACCAT
 TGGATGCCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCAT**CCAAAGGGAGTGAGACTTGGC**

Рис. 3. Нуклеотидная последовательность штамма CVS. Фрагмент соответствует позициям 3458–3996 генома вируса бешенства (GenBank NC001542).

Fig. 3. The nucleotide sequence of the CVS strain. The fragment corresponds to positions 3458–3996 of the rabies virus genome (GenBank NC001542).

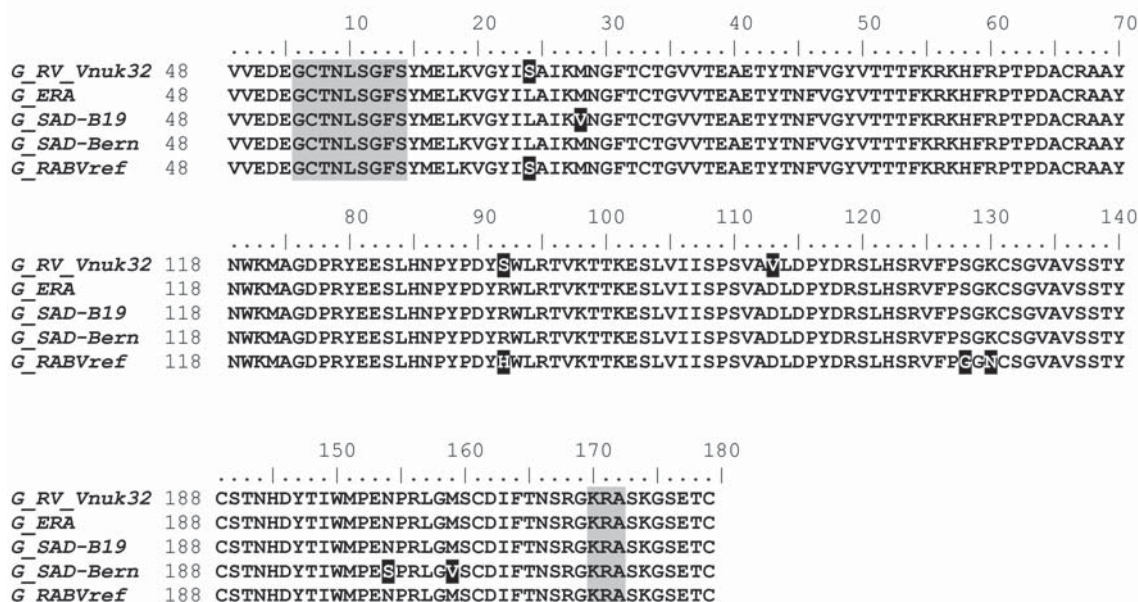


Рис. 4. Множественное выравнивание части белка G ряда штаммов группы SAD, кодируемых фрагментом вирусной РНК длиной 539 п.н. Черным фоном выделены аминокислотные остатки, отличающиеся от консенсусных, серым фоном — известные эпитопные участки белка G, расположенные на этом участке. Из рассмотрения удалены последовательности для штаммов ERA-VC и SAG-2, полностью совпадающие с последовательностями для штаммов ERA и SAD-B19 соответственно.
Fig. 4. Multiple alignment of a portion of protein G of a number of SAD strains encoded by a viral RNA fragment, 539 bp in length. The amino acid residues that differ from consensus amino acids residues are highlighted in black, known epitope regions of protein G located in this area are highlighted in grey. The sequences of ERA-VC and SAG-2 strains that coincide completely with the sequences of ERA and SAD-B19 strains, respectively, were excluded from the analysis.

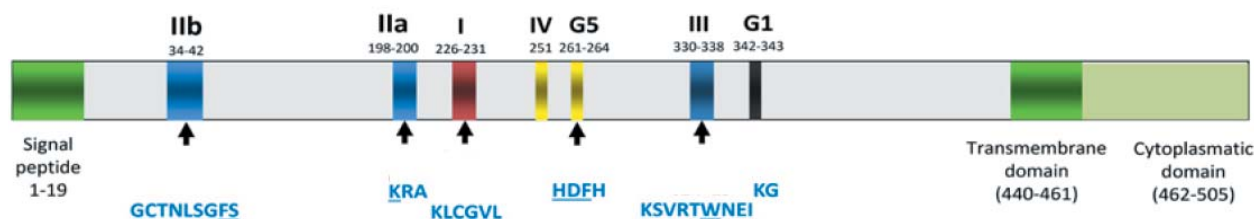


Рис. 5. Схематическое представление белка G вируса бешенства и расположение выявленных в нем эпитопных участков. Синим цветом указаны аминокислоты, соответствующие эпитопным участкам. Координаты участков приведены для зрелого белка (без учета участка сигнального пептида) (по N. A. Kuzmina [14] с изменениями).
Fig. 5. Schematic representation of the rabies virus protein G and location of identified epitope regions. The amino acids corresponding to the epitope regions are printed in blue. The coordinates of the regions are given for the mature protein (excluding the signal peptide region) (adapted from N. A. Kuzmina [14]).

Сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых фрагментом гена G, соответствующего позициям 3458–3996 генома вируса бешенства. Возможное влияние аминокислотных замен на антигенные свойства белка G

Для определения изменений в первичной структуре белка G, вызванных заменами нуклеотидов в изучаемом фрагменте гена белка G, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых этим фрагментом в выбранной группе геномов штаммов вируса бешенства (рис. 4).

Первичная структура участка белка G вируса бешенства штамма Внуково-32 содержит 3 аминокислотные замены по сравнению с консенсусными (наиболее часто встречающимися) аминокислотными остатками для вирусов всей группы SAD. Из них наиболее значимой является замена, приводящая к резкому изменению полярности аминокислотных остатков — D→V (позиция 113 в данном выравнивании).

Изучению антигенных свойств белка G вируса бешенства посвящены исследования, в которых были выявлены короткие участки этого белка, являющиеся антигенными детерминантами (эпитопами) для известных моноклональных антител к вирусу бешенства [14]. Полученные данные представлены в работе X. Liu с соавт. [6]. Обнаруженные к настоящему времени основные антигенные участки белка G вируса показаны на рисунке 5 [14].

Сравнение этих данных с выравниванием, приведенным на рисунке 4, показывает, что часть белка G, кодируемая изучаемым фрагментом 539 п.н., содержит два эпитопа (GCTNLSGFS и KRA; выделены на рис. 4 серым цветом фона). Эти последовательности белка G не содержат изменений ни у одного из рассмотренных штаммов. Таким образом, по имеющимся данным, белок G из штамма Внуково-32 содержит как минимум два неизменных эпитопных участка, способных участвовать в выработке иммунного ответа у вакцинируемых. Все три наблюдаемые замены аминокислотных остатков расположены между двумя антигенными участками и, вероятно, не оказы-

вают существенного влияния на пространственную структуру белка и изменение его экспонируемых частей. К сожалению, трехмерная структура белка G вируса бешенства до сих пор не установлена, что не дает возможности определить экспонируемые части белка и положение в нем части, кодируемой фрагментом 539 п.н., более точно.

Выводы

1. Структура РНК вируса бешенства штаммов Внуково-32, CVS, кодирующая часть фрагмента белка G, соответствует аналогичному фрагменту РНК вируса бешенства.

2. Структура РНК штамма вируса бешенства Внуково-32, используемого в ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», длиной 539 п.н., кодирующая фрагмент белка G, является стабильной на этапах производства.

3. В изученной части нуклеотидной последовательности штамм вируса бешенства CVS гомологичен нуклеотидным последовательностям штаммов вируса бешенства CVS, используемых в других странах.

4. Показана возможность применения рестрикционного анализа для подтверждения подлинности штамма Внуково-32 вируса бешенства на всех этапах производства, включая готовую форму вакцины.

Вклад авторов. Г. М. Игнатъев — идея и дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов исследования; А. С. Оксанич — дизайн исследования, расчет праймеров, проведение секвенирования, анализ результатов исследования; Л. П. Антонова — проведение полимеразной цепной реакции, написание и доработка текста; Т. Г. Самарцева — проведение полимеразной цепной реакции, секвенирование; С. В. Мосолова — подготовка образцов штаммов вируса бешенства; К. М. Мефед — выделение РНК из образцов готовой формы вакцины, анализ результатов исследования; Л. В. Гмыль — обсуждение дизайна исследования, сравнение аминокислотных последовательностей, кодируемых фрагментом гена G, анализ результатов исследования; Н. А. Нетесова — дизайн исследования, проведение анализа первичной структуры полноразмерных последовательностей штаммов вирусов бешенства, выбор нуклеотидных маркеров.

Authors' contributions. Georgy M. Ignatyev—elaboration of the study idea and design, analysis and interpretation of the results; Aleksey S. Oksanich—elaboration of the study design, calculation of primers, performing sequencing, analysis of the results; Liliya P. Antonova—performing polymerase chain reaction, writing and editing of the text; Tatyana G. Samartseva—performing polymerase chain reaction and sequencing; Svetlana V. Mosolova—preparation of the samples of the rabies virus strains; Kirill M. Mefed—isolation of RNA from the finished dosage form of the vaccine, analysis of the study results; Larisa V. Gmyl—discussion of the study design, comparison of the amino acid sequences encoded by the G gene fragment, analysis of the study results; Nina A. Netesova—elaboration of the study design, analysis of the primary structure of full-length sequences of the rabies virus strains, selection of nucleotide markers.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Г. М. Игнатъев является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. Georgy M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of the *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Литература/References

- Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4):e0003709. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>
- Zhang Y, Zhang S, Li W, Hu Y, Zhao J, Liu F, et al. A novel rabies vaccine based on toll-like receptor 3 (TLR3) agonist PIKA adjuvant exhibiting excellent safety and efficacy in animal studies. *Virology*. 2016;489:165–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.10.029>
- Ertl HCJ. New rabies vaccines for use in humans. *Vaccines*. 2019;7(2):54. <https://doi.org/10.3390/vaccines7020054>
- Morimoto K, Shoji Y, Inoue S. Characterization of P gene-deficient rabies virus: propagation, pathogenicity and antigenicity. *Virus Res*. 2005;111(1):61–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.011>
- Ito N, Sugiyama M, Yamada K, Shimizu K, Takayama-Ito M, Hosokawa J, et al. Characterization of M gene-deficient rabies virus with advantages of effective immunization and safety as a vaccine strain. *Microbiol Immunol*. 2005;49(11):971–9. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03692.x>
- Liu X, Yang Y, Sun Z, Chen J, Ai J, Dun C, et al. A recombinant rabies virus encoding two copies of the glycoprotein gene confers protection in dogs against a virulent challenge. *PLoS One*. 2014;9(2):e87105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087105>
- Hu SC, Hsu CL, Lee MS, Tu YC, Chang JC, Wu CH, et al. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(4):782–5. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171696>
- Nokireki T, Tammiranta N, Kokkonen UM, Kantala T, Gadd T. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65(3):593–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12833>
- Amarasinghe GK, Ayllón MA, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Blasdel KR, et al. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2019. *Arch Virol*. 2019;164(7):1967–80. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04247-4>
- Picard-Meyer E, Beven V, Hirschaud E, Guillaume C, Larcher G, Robardet E, et al. Lleida Bat Lyssavirus isolation in *Miniopterus schreibersii* in France. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(2):254–8. <https://doi.org/10.1111/zph.12535>
- Geue L, Schares S, Schnick C, Kliemt J, Beckert A, Freuling C, et al. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife. *Vaccine*. 2008;26(26):3227–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.04.007>
- Kissi B, Badrane H, Audry L, Lavenu A, Tordo N, Brahimi M, et al. Dynamics of rabies virus quasispecies during serial passages in heterologous hosts. *J Gen Virol*. 1999;80(8):2041–50. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-2041>
- Dietzgen RG, Kondo H, Goodin MM, Kurath G, Vasilakis N. The family *Rhabdoviridae*: mono- and bipartite negative-sense RNA viruses with diverse genome organization and common evolutionary origins. *Virus Res*. 2017;227:158–70. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.010>
- Kuzmina NA, Kuzmin IV, Ellison JA, Rupprecht CE. Conservation of binding epitopes for monoclonal antibodies on the rabies virus glycoprotein. *J Antivir Antiretrovir*. 2013;5(2):037–43.

Об авторах / Authors

Игнатъев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. *Georgy M. Ignatyev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук. *Aleksey S. Oksanich*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>

Антонова Лилия Петровна. *Liliya P. Antonova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1221-1134>

Самарцева Татьяна Геннадьевна. *Tatyana G. Samartseva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>

Мосолова Светлана Владимировна. *Svetlana V. Mosolova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9177-9712>

Мефед Кирилл Михайлович, канд. биол. наук. *Kirill M. Mefed*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7335-1982>

Гмыль Лариса Вениаминовна. *Larisa V. Gmyl*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1494-411X>

Нетесова Нина Александровна, д-р биол. наук. *Nina A. Netesova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9896-5403>

Поступила 26.03.2020

После доработки 25.05.2020

Принята к публикации 27.05.2020

Received 26 March 2020

Revised 25 May 2020

Accepted 27 May 2020