

УДК 578.76

Разработка метода оценки структурной гетерогенности популяции разных штаммов вируса клещевого энцефалита

Тучинская К.К.¹, Волок В.П.¹, Илларионова В.В.¹, Ковалева О.И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П.Чумакова» Российской академии наук. 108819, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем тяжелого неврологического заболевания человека и широко распространен на территории Евразии. При репродукции флавивирусов помимо инфекционных вирионов накапливается набор неинфекционных вирусных структур: незрелые формы вирионов, пустые формы (не содержащие геном вирусные частицы), а также агрегаты поверхностного белка E, способные оказывать влияние на иммунный ответ, и патогенез. Штаммы ВКЭ могут различаться по соотношению этих форм в инфекционном материале, т.е. по характеру структурной гетерогенности. **Цель:** подобрать комплекс методов, способных выявить данные различия. **Методы.** Общую концентрацию белка E определяли методом ИФА, число частиц, содержащих геном (ГСЧ) — ПЦР в реальном времени, а для выявления инфекционных вирусных частиц — титрование в культуре клеток. **Результаты.** Разработан метод оценки структурной гетерогенности популяции ВКЭ. Было показано, что повышенное содержание неинфекционных вирусных частиц, содержащих геном, и несвязанных с ними белка E не зависит от подтипа вируса. **Выводы.** Штаммы ВКЭ отличились по соотношению общего числа ГСЧ к числу инфекционных вирионов и по содержанию белка E, связанного и несвязанного с ГСЧ.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; структурная гетерогенность; неинфекционные вирусные частицы.

Для цитирования: Тучинская К.К., Волок В.П., Илларионова В.В., Ковалева О.И. Разработка метода оценки структурной гетерогенности популяции разных штаммов вируса клещевого энцефалита. Патогенез. 2018; 16(3): 108–111

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.108-111

Для корреспонденции: Тучинская Ксения Константиновна; kseniya-tuchka@mail.ru

Финансирование: исследование проведено в рамках государственного задания № 0837-2014-0004.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 02.08.2018

Development of a method for assessing the structural heterogeneity of a population of different strains of tick-borne encephalitis virus

Tuchinskaya K.K.¹, Volok V.P.¹, Illarionova V.V.¹, Kovaleva O.I.²

¹ M.P.Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and- Biological Products of Russian Academy of Sciences, Settlement of the Institute of poliomyelitis, Home ownership 8 Bldg. 1, Settlement Moskovsky, Moscow 108819, Russian Federation

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is widespread in Europe and Asia and causes severe neurological disease in humans. It has been established that the reproduction of flaviviruses leads to the accumulation of a whole set of non-infectious viral structures aside from infectious virions. These structures include immature virions, empty forms (containing no genome) and aggregates of the surface protein E. These structures, despite being non-infectious, are able to influence the immune response and, consequently, the pathogenesis of TBEV infection. **The aim** of this work was to select a set of methods which can be implemented to identify these differences.

Methods. Virus samples were analysed for protein E concentration, number of genome-containing particles and infectivity. The total concentration of protein E in samples was evaluated using ELISA. The number of genome-containing particles was determined by a real-time PCR, and to assess the number of infectious virus particles titration in PEK cell culture was used. **Results.** An assay for total concentration of protein E in culture fluid of cells infected with different strains of TBEV based on the commercially available ELISA kit was developed. TBEV strains used in the study varied by the ratio of genome-containing particles to infectious virions. The amount of protein E not associated with genome-containing virions was calculated as a difference between total content of protein E and the amount of protein E bound to genome-containing particles. This amount was also different for studied samples of TBEV strains. **Conclusion.** No correlation was observed between the increased content of non-infectious genome-containing particles or the amount of residual protein E and TBEV subtypes.

Key words: tick-borne encephalitis; structural heterogeneity; non-infectious virus particles.

For citation: Tuchinskaya K.K., Volok V.P., Illarionova V.V., Kovaleva O.I. [Development of a method for assessing the structural heterogeneity of a population of different strains of tick-borne encephalitis virus]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(3): 108–111 (in Russian)

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.03.108-111

For correspondence: Tuchinskaya Kseniya Konstantinovna, e-mail: kseniya-tuchka@mail.ru

Funding. The study was conducted as part of a government assignment № 0837-2014-0004.

Received: 02.08.2018

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) принадлежит к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и является высокопатогенным агентом для человека, передающимся через укусы инфицированных клещей [1]. Клещевой энцефалит (КЭ) может проходить в виде бессимптомной, лихорадочной, менингеальной или очаговой формы. Около трети пациентов, перенесших острую форму инфекции, имеют длительные остаточные поражения ЦНС разной степени тяжести. Исход заболевания определяется генетической предрасположенностью пациента к заболеванию, иммунным статусом и сопутствующими инфекциями, инфекционной дозой вируса, а также свойствами вирусной популяции.

Известно три подтипа ВКЭ: сибирский, европейский и дальневосточный. Частота встречаемости определенных форм заболевания и летальность при КЭ отличаются в зависимости от подтипа вируса, циркулирующего на данной территории [2]. Наиболее значимым, с точки зрения иммуногенности, является поверхностный структурный белок Е ВКЭ, который отвечает за начальные этапы инфекции и является индуктором нейтрализующих антител.

Для флавивирусов характерна структурная гетерогенность, которая возникает при репродукции в клетках. При этом образуется целый ансамбль частиц, различающихся по своей структуре: зрелые инфекционные вирионы, неинфекционные незрелые формы, пустые формы (не содержащие геном вирусные частицы), а также агрегаты поверхностного белка Е [3], которые могут влиять на формирование противовирусного иммунного ответа. Очевидно, что соотношение различных форм вирусных частиц может оказывать значительное влияние на иммунный ответ и патогенез при КЭ.

Целью данной работы было подобрать наиболее информативный метод определения количественного содержания поверхностного белка Е в пробах ВКЭ и оценить соотношение количества белка к числу инфекционных и геном-содержащих частиц (ГСЧ), для штаммов, представляющих разные подтипы ВКЭ.

Материалы и методы исследования

Вирусы и культуры клеток. Штаммы ВКЭ, используемые в работе, представлены в табл. 1. Вирусы хранились в виде аликвот культуральной жидкости (КЖ) тинфицированных клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ) при -70°C .

Титрование в культуре клеток СПЭВ проводили методом бляшек под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ по ранее описанной методике [4].

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез белков проводили в 12% ПААГ в денатурирующих условиях с использованием буфера (3% додецилсульфата натрия; 7,5% 2-меркаптоэтанола) на приборе BIO RAD. Гель окрашивали реагентом Кумасси. Оптическую плотность полос определяли по интегральной площади пиков полос в геле в программе OneDscan (DSP Inc., USA).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили по ранее описанной методике [5].

Иммуноферментный анализ проводили с использованием набора ВекторБест ВКЭ-антиген (Россия) согласно протоколу.

Для статистической обработки данных был использован пакет стандартных программ Microsoft Excel.

Результаты исследования

Каждая из форм, образующихся в процессе репродукции вируса: зрелые инфекционные вирусные частицы, незрелые вирионы, пустые формы (лишенные нуклеокапсида), а также агрегаты поверхностного белка Е, — вносят определенный вклад в количество общего белка Е.

Характеристика первого стандарта

Для измерения общего количества белка Е с помощью электрофореза в ПААГ был использован очищенный и концентрированный препарат ВКЭ штамма Софьин (СТ1), любезно предоставленный д.б.н. В.Н. Ляпустиным [6]. В качестве стандартов использовали пробы белка бычьего сывороточного альбумина (БСА, Combithek)

Таблица 1

Штаммы ВКЭ, используемые в работе

Подтип ВКЭ	Штамм ВКЭ	№ доступа GeneBank
Дальневосточный	ДВ-936к	GU125722
	Софьин-КГГ	GU121963
Европейский	Абсеттаров	KU885457
	ЛК-138	GU125720
	256	AF091014
Сибирский	ЭК-328	DQ48686
	TV08-T2546	KU052690
	Васильченко	L40361

с известной концентрацией. Концентрация белка Е в СТ1 составила $0,078 \pm 0,007$ мг/мл. Каждый эксперимент был проведен в трех повторах.

Характеристика второго стандарта

СТ1 представляет собой концентрированный очищенный препарат. В качестве наиболее удобного и информативного метода для определения концентрации белка Е в неконцентрированных пробах ВКЭ был выбран иммуноферментный анализ (ИФА). Для этого мы приготовили СТ2, который представлял собой аликвоты КЖ клеток, инфицированных ВКЭ штамм ЭК-328. Методом наименьших квадратов был построен график зависимости оптической плотности ($\lambda = 450$ нм), определенной в ИФА, от концентрации белка Е в СТ1 в 8 последовательных разведениях. Концентрация белка Е в СТ2 составила $0,025 \pm 0,004$ мг/мл. Каждое измерение повторяли минимум три раза.

Определение концентрации белка Е в пробах разных штаммов ВКЭ

Был выбран набор штаммов, представляющих три генотипа ВКЭ (табл. 1), полученных в культуре клеток СПЭВ в одинаковых условиях.

Для количественного определения белка Е в пробах КЖ был проведен ИФА с использованием стандарта СТ2. Концентрации белка Е в пробах исследуемых штаммов вируса представлена в табл. 2. Каждое измерение проводили в трех повторах.

Определение соотношения инфекционных и неинфекционных вирусных частиц в пробах разных штаммов ВКЭ

Далее оценили соотношение геном-содержащих геном (ГСЧ), к числу частиц, способных вызывать инфекцию в культуре клеток.

Количество общего числа ГСЧ, которые были определены методом ПЦР в реальном времени, инфекционных форм вируса, определенных при титровании методом бляшек в культуре клеток СПЭВ, и их соотношение представлены в табл. 3.

Оценка соотношения разных форм белка Е

Массу белка Е, связанного с ГСЧ рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 180 \cdot Mr(E)}{N_A}$$

где:

A — количество ГСЧ;

Mr(E) — молекулярная масса белка Е (53000) Да;

N_A — число Авогадро ($6,022 \cdot 10^{23}$).

Таким образом, зная количество копий вирусной РНК в пробе КЖ инфицированных клеток, можно посчитать количество белка, которое приходится на ГСЧ, и рассчитать разницу между общей концентрацией белка Е, определенной методом ИФА, и концентрацией белка Е, связанного с ГСЧ (рисунок).

Концентрация белка Е (мг/мл) в пробах разных штаммов ВКЭ

Таблица 2

Подтип ВКЭ	Штамм ВКЭ	С белка Е, мг/мл
Дальневосточный	ДВ-936	$0,0549 \pm 0,0058$ *
	Софьин-КГГ	$0,0179 \pm 0,0050$
Европейский	Абсеттаров	$0,0125 \pm 0,0025$
	ЛК-138	$0,0120 \pm 0,0012$
	256	$0,0390 \pm 0,0060$ *
Сибирский	ЭК-328	$0,0047 \pm 0,0013$
	TV08-T2546	$0,0151 \pm 0,0021$
	Васильченко	$0,0550 \pm 0,0160$ *

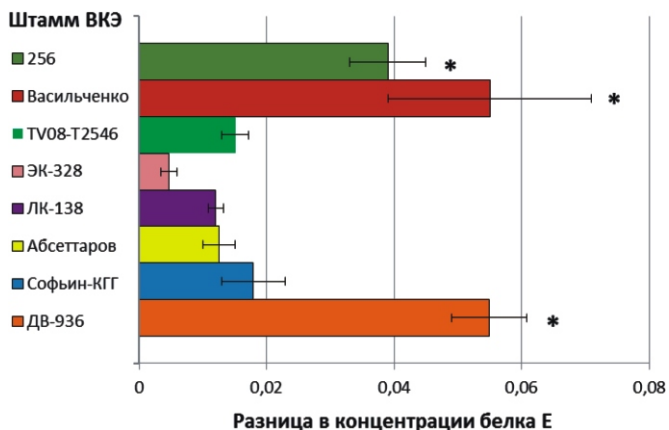
Примечание. * — значимо больше, чем в других препаратах вируса (внутри подтипа)

Количество ГСЧ в 1 мл вирусного препарата, количество инфекционных вирусных частиц (БОЕ) в 1 мл и разница между ними

Таблица 3

Подтип ВКЭ	Штамм ВКЭ	Ig(ГСЧ)/мл	Ig(БОЕ)/мл	Ig(ГСЧ) Ig(БОЕ)
Дальневосточный	ДВ-936к	$9,74 \pm 0,30$	$6,62 \pm 0,30$	$3,12 \pm 0,43$ *
	Софьин-КГГ	$8,62 \pm 0,30$	$8,14 \pm 0,30$	$0,48 \pm 0,43$
Европейский	Абсеттаров	$8,61 \pm 0,30$	$7,62 \pm 0,30$	$0,99 \pm 0,43$
	ЛК-138	$9,21 \pm 0,30$	$6,28 \pm 0,30$	$2,93 \pm 0,43$ *
	256	$9,00 \pm 0,30$	$5,96 \pm 0,30$	$3,04 \pm 0,43$ *
Сибирский	ЭК-328	$9,49 \pm 0,30$	$7,50 \pm 0,30$	$1,99 \pm 0,43$
	TV08-T2546	$9,24 \pm 0,30$	$7,62 \pm 0,30$	$1,62 \pm 0,43$
	Васильченко	$9,06 \pm 0,30$	$7,10 \pm 0,30$	$1,96 \pm 0,43$

Примечание. * — значимо больше, чем в других препаратах вируса (внутри подтипа)



Разница в количестве белка E, определенного методом ИФА и рассчитанного по формуле относительно ГСЧ. * — значимо больше, чем в других препаратах вируса (внутри подтипа).

Максимальные отличия в количестве белка E, не связанного с ГСЧ, были выявлены в пробах КЖ клеток СПЭВ, инфицированных штаммами ВКЭ ДВ-936к, Васильченко и 256 (рисунок).

Выводы

Разработан метод оценки структурной гетерогенности популяции ВКЭ с использованием коммерческого набора для ИФА.

Штаммы ВКЭ отличились по соотношению общего числа ГСЧ к числу инфекционных вирусных частиц и по содержанию белка E, связанного и не связанного с ГСЧ.

Повышенное содержание в популяции неинфекционных ГСЧ, и не связанного с ними белка E, не зависит от подтипа вируса.

Сведения об авторах:

Тучинская Ксения Константиновна — младший научный сотрудник лаборатории биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П.Чумакова» Российской академии наук

Волок Виктор Павлович — лаборант-исследователь лаборатории биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П.Чумакова» Российской академии наук

Илларионова Виктория Владимировна — лаборант-исследователь лаборатории биологии арбовирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П.Чумакова» Российской академии наук

Ковалева Ольга Игоревна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научно-аналитического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Список литературы

- Lindenbach B. D., Rice C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59, 23-61. DOI: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9
- King A.M.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, 2012.
- Felix A.R., Stiasny K., Heinz F.X. Flavivirus structural heterogeneity: implication for cell entry. *Curr. Opin. Virol.* 2017; 24:132-139.
- Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks ? evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick-borne Dis.* 2012; 3(4): 240-246. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.05.005
- Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivianian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V., Rumyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology.* 2007; 362: 75-84. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.013
- Ляпустин В.Н., Ворович М.Ф. *Способ получения вирионного антигена вируса клещевого энцефалита.* Патент РФ № 2402606, 2010.

References

- Lindenbach B. D., Rice C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 2003; 59, 23-61. DOI: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9
- King A.M.Q., Lefkowitz E., Adams M.J., Carstens E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, 2012.
- Felix A.R., Stiasny K., Heinz F.X. Flavivirus structural heterogeneity: implication for cell entry. *Curr. Opin. Virol.* 2017; 24:132-139.
- Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks ? evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick-borne Dis.* 2012; 3(4): 240-246. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.05.005
- Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivianian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V., Rumyantsev A.A., Burenkova L.A., Lashkevich V.A., Karganova G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology.* 2007; 362: 75-84. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.013
- Ljapustin V.N., Vorovich M.F. *[Method of obtaining virion antigen of tick-borne encephalitis virus].* The patent of the Russian Federation No. 2402606, 2010 (In Russian)