

Жилин Е.С., Акматова Э.К., Сансызбай А.Р.

ВЫБОР СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММ «VRC-RZ2»

E.S. Zhilin, E.K. Akmatova, A.R. Sansyzbai

THE CHOICE OF SYSTEM OF DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF RABIES VIRUS STRAIN «VRC-RZ2»

УДК 578.824.1:57.085.23

Испытаны методы титрования вируса бешенствана мышах, а также на культуре клеток по цитопатическому эффекту, фокусам флуоресценции бляшкообразованию. В результате исследований установлено, что наиболее чувствительными являются методы титрования вируса на культуре клеток по фокусам флуоресценции и метод определения биологической активности на мышах. Установлены коэффициенты корреляции титра вируса в разных системах, позволяющие провести пересчет биологической активности между ними. Учитывая, что штамм «VRC-RZ2» репродуцируется в культурах клеток с характерной специфической деструкцией клеточного монослоя, наиболее приемлемой системой выбран метод титрования вируса бешенства на культуре клеток по цитопатическому действию.

Methods of titration of rabies virus on mice and also on cell cultures by the cytopathic effect, focuses of fluorescence and plaque formation are tested. As the results of research it has been demonstrated that methods of titration of virus on cell cultures by the focuses of fluorescence and method of detection of the biological activity on mice are the most sensitive. The correlation index of virus titer in the different systems allowing to provide conversation of biological activity between them are established. Considering that "VRC-RZ2" strain is reproduced in cell cultures with the characteristic specific destruction of cellular monolayer, the method of titration of rabies virus on cell cultures by the cytopathic effects chosen as the most acceptable system.

Құтырық вирусын тышқандарда, сонымен қатар торша өсіндісін децитопатиялық әсері бойынша, бляшка түзілуінің флуоресценттік фокусында сұйылту әдісі сыналды. Зерттеу нәтижесінде флуоресценция фокусы бойынша торша өсіндісінде сұйылту әдісі және биологиялық белсенділігін тышқан дардаанықтау әдісанағұрлым сезімтал болып табылды. Олардың арасындағы биологиялық белсенділіктің айта санау үшін әр түрлі жүйедегі вирус сұйылтуының корреляция коэффициенті белгіленді. Штамм «VRC-RZ2» торша өсіндісін деторшабір қабатының өзіне тән бұзылуымен репродукцияланатыны несепке ала отырып, құтырық вирусын цитопатиялық әсері бойынша торша өсіндісінде сұйылту ең тиімді жүйе болып таңдалды.

Введение

Бешенство остается актуальной проблемой в глобальном смысле, являясь одной из самых опасных болезней человека и животных. Анализ статистических данных по бешенству животных в Республике Казахстан (РК) за последние годы, свидетельствует о неблагоприятной эпизоотической ситуации

в стране. В настоящее время в РК ежегодно выявляется более 100 неблагополучных по бешенству пунктов [1]. Регистрируются случаи заражения человека [2].

Одним из основных и действенных способов предотвращения заболевания бешенством является вакцинация животных. Для специфической профилактики бешенства собак, кошек, а также сельскохозяйственных животных применяют парентеральные инактивированные вакцины. Профилактика заболевания диких животных осуществляется с использованием антирабических вирусвакцин для орального применения.

Основой большинства современных антирабических препаратов являются фиксированные вирусы бешенства (ВБ). Эффективность антирабических препаратов находится в прямой зависимости от биологической активности вируса. Исследователями установлены эффективные дозы ВБ в вакцине для перорального введения, которые составляют 5,5-6,5 lg MLD₅₀ [3]. При приготовлении инактивированных вакцин авторами приводятся данные о минимальном уровне активности ВБ до этапа инактивации, который составляет не менее 4,5 lg MLD₅₀ [4]. В альтернативу классическому методу титрования ВБ методом интрацеребрального заражения мышей, выраженного в lg MLD₅₀, в настоящее время предложены методы титрования: по цитопатическому действию вируса (lg ТЦД₅₀), фокусам флуоресценции (lg FFU₅₀) и бляшкообразованию (БОЕ) [4, 5]. Каждый из перечисленных методов имеет свои преимущества и ограничения, связанные со свойствами используемого штамма ВБ, а также необходимостью использования дополнительных реактивов, оборудования или животных. В тоже время, в литературе практически отсутствуют данные о корреляции титров ВБ, полученных с использованием различных систем титрования.

Значимость заболевания бешенством животных для Казахстана и Кыргызстана, потребность в оптимизации технологии производства и методов контроля разработанных антирабических препаратов, отсутствиечетких регламентирующих рекомендаций по использованию той или иной системы определения биологической активности ВБ в процессе производства антирабических препаратов

определяет актуальность исследований в данном направлении.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось сравнительное изучение и выбор системы определения биологической активности вируса бешенства штамма «VRC-RZ2».

Материалы и методы

В работе использовали фиксированный штамм ВБ «VRC-RZ2», депонированный в депозитарии возбудителей особо опасных инфекций под номером П-7-04\Д; шведская сублиния культуры клеток ВНК-21 (Банк первичных и перевиваемых культур клеток НИИПББ); питательные среды – полусинтетическая среда для пристеночного культивирования клеток (ПСР) с добавлением L-глутамина (0,6г/л) и сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) в концентрации – 2,0%.

Для наработки ВБ проводили заражение сформированного монослоя клеток вирусом в дозе 0,1-1,0 ТЦД₅₀ на клетку. Инфицированные клетки инкубировали при температуре 35°C стационарным способом, рН ростовой среды поддерживали в пределах 7,2-7,4 ежедневным добавлением раствора соды (8,5% NaHCO₃). Длительность культивирования определяли по интенсивности поражения монослоя вирусом. При проявлении цитопатического поражения 70-80% монослоя клеток пробы замораживали при минус 70°C. После оттаивания вирусосодержащий материал из пробирок объединяли в один флакон.

Биологическую активность вирусосодержащего материала определяли по результатам цитопатического действия вируса путем титрования в пробирках с монослойной культурой клеток ВНК-21, в которые вносили десятикратные разведения вируса. Учет результатов проводили ежедневно, в течение 10 сут. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Определение биологической активности вируса по фокус формирующим единицам проводили путем инфицирования десятикратными разведениями вируса клеток ВНК-21, выращенных на предметных стеклах. Клетки инкубировали при 35°C в течение 5 сут. Инфицированную культуру клеток фиксировали в охлажденном химически чистом обезвоженном ацетоне в течение 60 мин, на препараты наносили меченый специфический иммуноглобулин в рабочем разведении 1:32-1:40. Выдерживали 40 мин во влажной камере при 37°C, стекла двукратно промывали в физиологическом или фосфатно-буферном растворе, затем ополаскивали дистиллированной водой, сушили на мостиках и микроскопировали под люминесценцией в масляной иммерсии. Для расчета титра

вируса определяли предельное разведение, при котором на стекле с инфицированной культурой клеток обнаруживаются фокусы флуоресценции. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Для определения инфекционной активности ВБ методом бляшек, наносили по 50 см³ клеточной суспензии ВНК-21, содержащей 0,25% агарозы в объеме 1 см³ на заранее подготовленную агарозную подложку (4,0% сыворотки крови, 0,25% агарозы) в чашке диаметром 60 мм. Клетки в агарозном слое инфицировали десятикратными разведениями вирусного инокулята в объеме по 0,1 см³ на чашку. Зараженные клетки инкубировали в условия СО₂-инкубатора с влажной атмосферой в течение 7 сут при 35°C. Для выявления бляшек в каждую чашку вносили по 2 мл 0,5 %-ной агарозы, содержащей нейтральный красный в разведении 1:10000. Через 4 часа проводили учет результатов. Учетное число бляшек (x), сформировавшихся при нанесении на клеточный монослой определенного разведения вируса (y) в объеме V использовали для расчета титра (n) в БОЕ/мл по уравнению:

$$n = x / y * V [1]$$

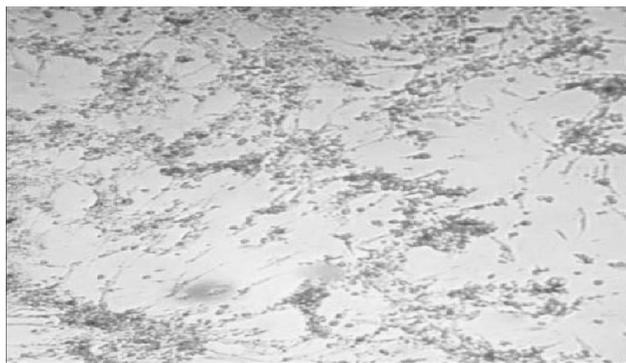
Для определения титра на мышах готовили 10-кратные разведения суспензии вируса на растворе Хенкса (10⁻¹ до 10⁻⁷) и каждым разведением заражали 4 белых мыши интрацеребрально в объеме 0,03 см³. За животными вели наблюдение в течение 14-21 дней (в зависимости от штамма вируса бешенства). Учет павших животных вели с 4 до 14 суток. Титр инфекционности рассчитывали по методу Рида и Менча.

Для получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили в трех повторениях.

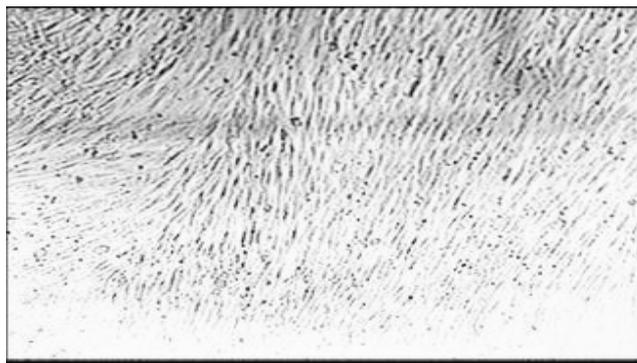
Результаты

С целью сравнительного изучения и выбора системы определения биологической активности вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» были испытаны методы титрования вируса на культуре клеток по цитопатическому эффекту, по фокусам флуоресценции, по бляшкообразованию, а также метод определения биологической активности на мышах.

В перевиваемой культуре клеток ВНК-21, инокулированной десятикратными разведениями вирусосодержащего материала наблюдали деструкцию монослоя и дегенерацию клеток, тогда как в контрольных (не инфицированных) культурах таких изменений не было (рис. 1).



а



б

Рисунок 1. Культура клеток ВНК-21:

а – ЦПД ВБ в инфицированной культуре клеток ВБ в разведении 10^{-3} , 5 сутки инкубирования (ув. Объектив $\times 10$, окуляр $\times 15$), б – неинфицированная культура клеток, 5 сутки инкубирования (ув. объектив $\times 10$, окуляр $\times 15$).

Деструктивные изменения не сопровождались лизисом клеток, а на фоне сохранившегося монослоя наблюдалась тенденция к специфической агрегации клеток (образование конгломератов) с небольшим разрежением монослоя, а также появлением отдельных светопреломляющих клеток округлой формы. Проявление цитопатического действия (ЦПД) вируса начиналось на 2 сут после инфицирования культур разведениями ВБ от 10^{-1} до 10^{-3} , а на 4-7 сут отмечали в разведениях от 10^{-4} до 10^{-6} .

Использование метода титрования по цитопатическому действию позволило установить биологическую активность вирусосодержащей суспензии, которая составила $(5,92 \pm 0,08) \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{мл}$.

При использовании метода титрования по фокус формирующим единицам результаты учитывали на 5 сутки после инфицирования культуры клеток. При этом в препаратах культур клеток инфицированных разведениями ВБ от 10^{-1} до 10^{-3} регистрировали более 80% клеток с флуоресцирующими включениями

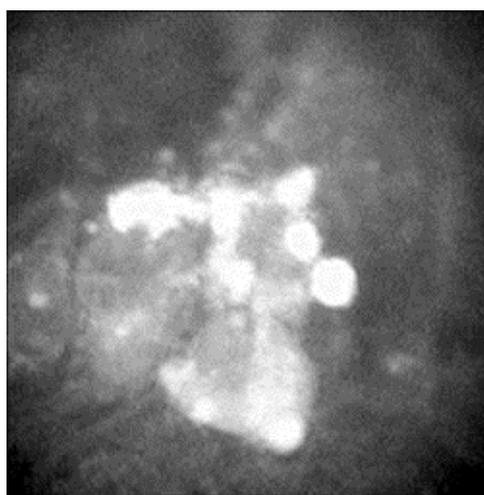
формированием, так называемых «фокусов флуоресценции» (рис. 2а). Также отмечали конгломерацию включений антигена ВБ в цитоплазме в области цитоплазматической мембраны и формирование крупных включений (рис. 2б). В некоторых клетках включения сливались и окрашивались вся или большая часть цитоплазмы (рис. 2в).

В препаратах культур клеток инокулированных от 10^{-4} до 10^{-5} разведениями ВБ наблюдали экспрессию специфического антигена вируса бешенства, преимущественно на цитоплазматической мембране в виде крупных зерен и гранул, имеющих размеры от мало заметных до четко выраженных (рис. 2г).

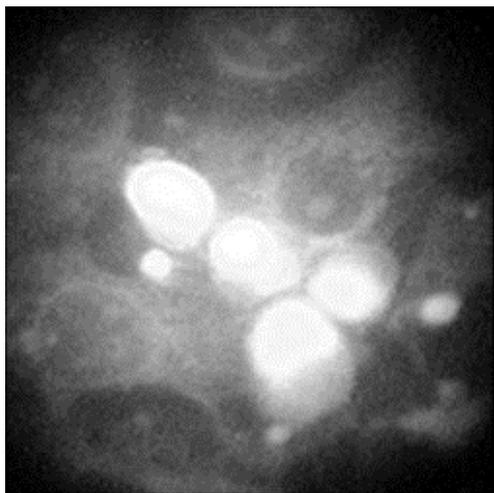
В препаратах, инфицированных разведениями ВБ 10^{-6} и отдельных препаратах - 10^{-7} , антиген обнаруживали в цитоплазме клеток в виде гранул изумрудного свечения (рис. 2д). В препаратах с неинфицированными клетками не было обнаружено специфических флуоресцирующих включений (рис. 2е).



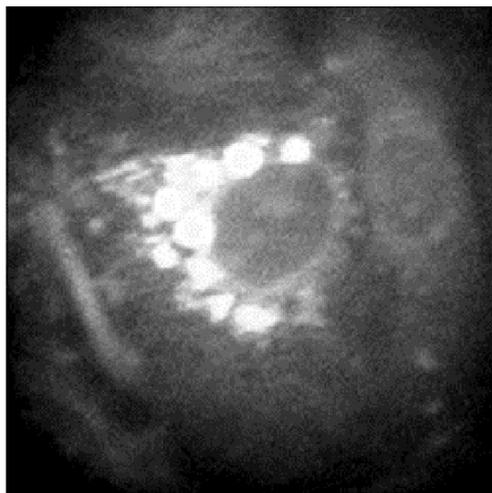
а



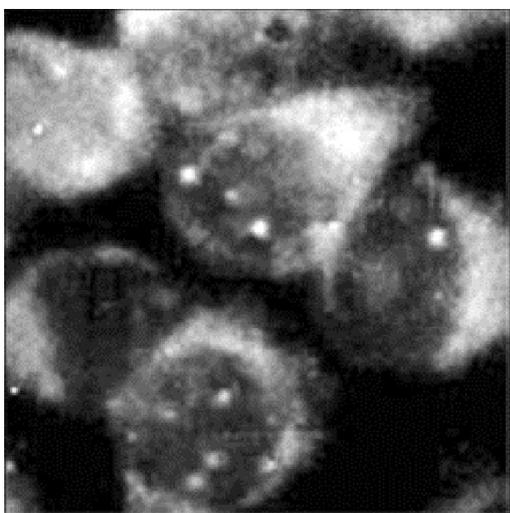
б



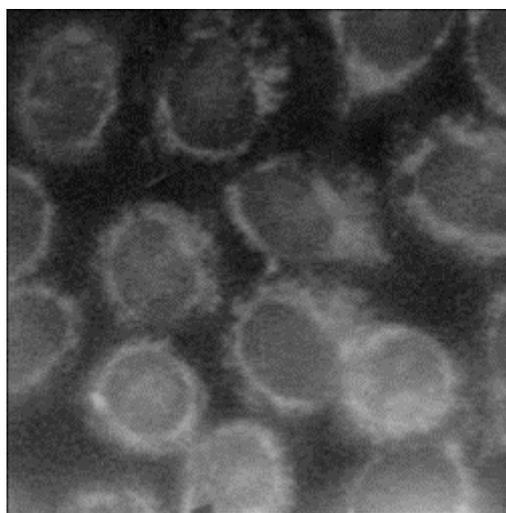
в



г



д



е

Рисунок 2. Результаты титрования ВБ с использованием метода фокус формирующих единиц (препараты культур клеток ВНК-21, обработанные антирабическим глобулином конъюгированным с флуоресцеин изотиоционатом натрия, ув. объектив $\times 90$, окуляр $\times 10$):

а-в – клетки инфицированные ВБ в разведении 10^{-1} - 10^{-3} ; г – клетки инфицированные ВБ в разведении 10^{-4} - 10^{-5} , д – клетки инфицированные ВБ в разведении 10^{-6} - 10^{-7} , е – неинфицированные клетки.

Использование метода титрования по фокус формирующим единицам позволило установить титр вирусосодержащей суспензии, который составил $(6,67 \pm 0,14) \text{ lg FFU}_{50}/\text{мл}$.

На следующем этапе работ определяли биологическую активность ВБ с использованием метода бляшек. В чашках с агарозной культурой клеток, инфицированной разведениями вируса от 10^{-1} до 10^{-4} ,

отмечали большую плотность бляшек, сливающихся друг с другом (рис. 3а, 3б). Начиная с разведения 10^{-5} по 10^{-7} , выявляли обособленные друг от друга бляшки, количество которых уменьшалось прямо пропорционально разведению ВБ (рис. 3в). В контрольных - незараженной культуре клеток бляшек не обнаруживали (рисунок 3д).

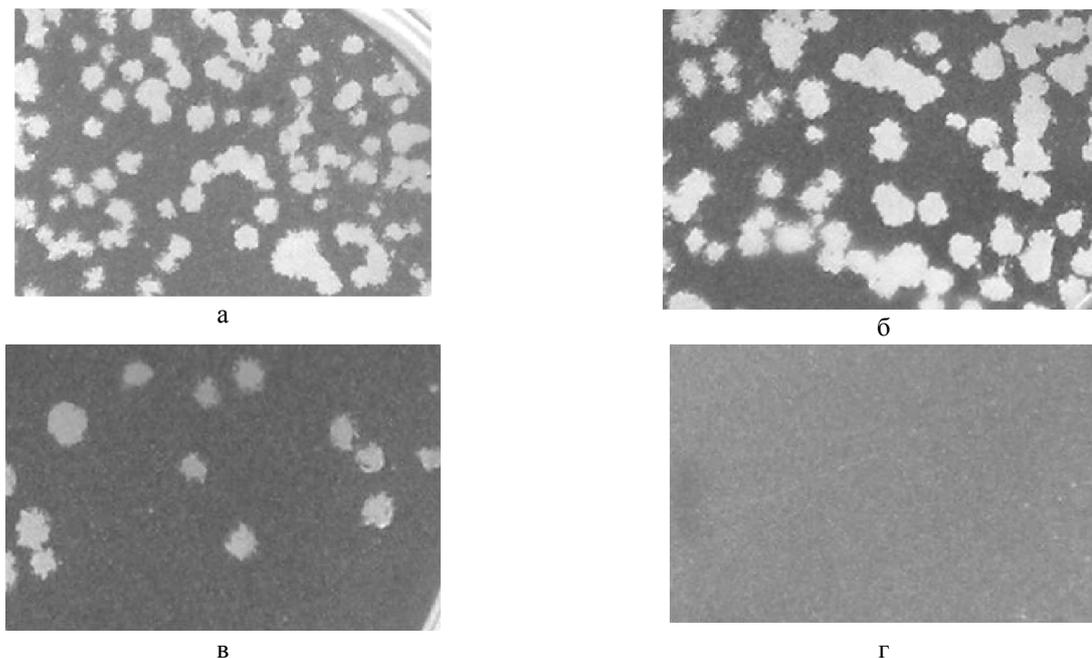


Рисунок 3. Результаты титрования вируса бешенства с использованием метода бляшек: а-б – бляшки на культуре клеток, инфицированной ВБ в разведении 10^{-1} – 10^{-4} ; в – бляшки на культуре клеток, инфицированной ВБ в разведении 10^{-5} – 10^{-7} , г – неинфицированные клетки.

Использование метода титрования по методу бляшек позволило установить биологическую активность вирусосодержащей суспензии, которая составила $(7,33 \pm 0,17) \lg \text{БОЕ}_{50}/\text{мл}$.

На завершающем этапе работ определяли биологическую активность испытуемого материала путем интрацеребрального заражения мышей десятикратными разведениями ВБ. Начиная с 4-х суток после

заражения, отмечали заболевание мышей, характеризующееся признаками паралитической формы бешенства (взъерошенность (рис. 4а), замедленные круговые и хаотичные движения (рис. 4б), тремор, конвульсии (рис. 4в), параличи конечностей (рис. 4г)). Гибель мышей регистрировали на 5-8 сут после заражения.

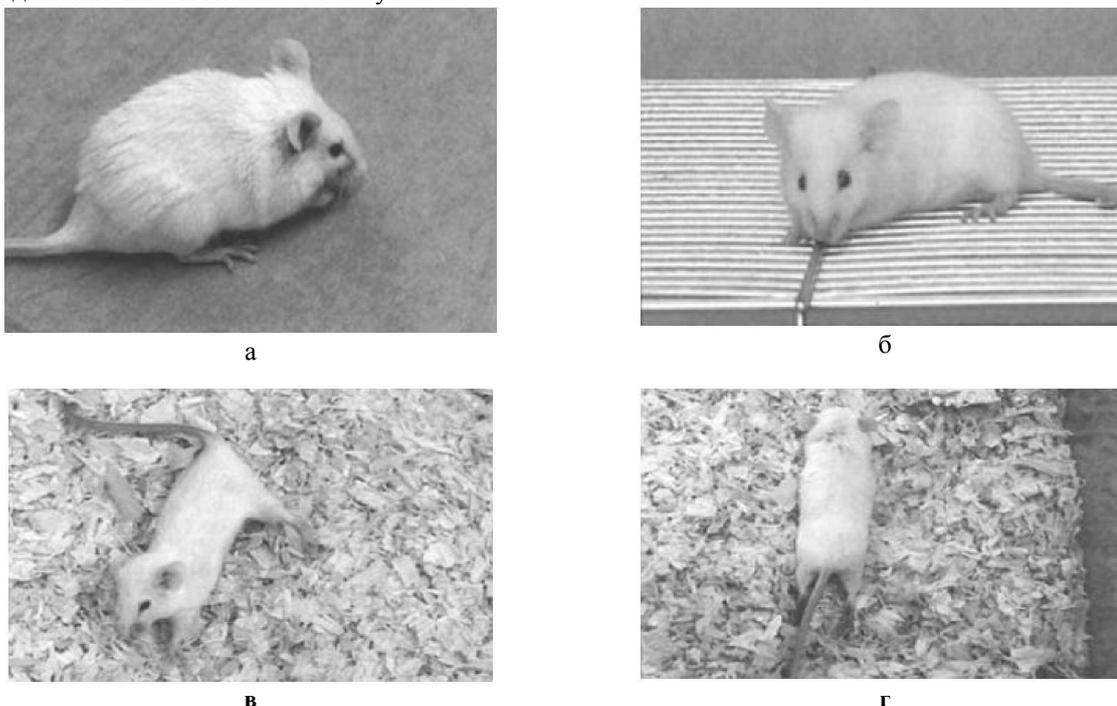


Рисунок 4. Клинические признаки паралитической формы бешенства: а - взъерошенность, сгорбленное состояние; б - замедленные движения, движения по кругу; в- хаотичные движения, тремор, конвульсии; г - признаки паралича.

Титр ВБ в испытуемом материале при использовании метода титрования позволил установить титр вирусодержащей суспензии, который составил $(7,42 \pm 0,17) \lg \text{МЛД}_{50}/\text{мл}$.

Полученные в ходе экспериментов данные скомпилированы в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения титра культуральной суспензии ВБ штамм «VRC-RZ2» с использованием различных методов определения биологической активности

Метод определения биологической активности	Срок проведения исследований, сут	Основа системы титрования	Используемые материалы, оборудование	Титр вируса	Корреляц. коэфф. *, lg
По ЦПД	до 10	культура клеток	термостат, световой микроскоп	$5,92 \pm 0,08$ $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	1,25
По фокусам флуоресценции	до 5	культура клеток	конъюгат ФИТЦ с антираб. иммуно- глобулином, ацетон, термостат, люминесцентный микроскоп	$6,67 \pm 0,14 \lg$ $\text{FFU}_{50}/\text{мл}$	1,11
По бляшкам	до 7	культура клеток	агароза, термостат	$7,33 \pm 0,17$ $\lg \text{БОЕ}_{50}/\text{мл}$	1,01
Биопроба	4-14	мыши	виварий для животных	$7,42 \pm 0,17$ $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{мл}$	1,00

Примечание: * - корреляционный коэффициент в сравнении с классическим методом биопробы на мышах

Из данных таблицы 1 следует, что коэффициент корреляции с классической системой титрования ВБ штамм «VRC-RZ2» на мышах составляет для методов определения биологической активности по ЦПД, по фокусам флуоресценции, по бляшкам – 1,25, 1,11 и 1,01 соответственно. Следует отметить, что наиболее чувствительными из испытанных методов, являются методы титрования вируса бешенства по бляшкам и определение биологической

активности ВБ на мышах. На порядок ниже была чувствительность метода определения биологической активности ВБ по цитопатическому действию на культуре клеток.

Для проверки полученных коэффициентов корреляции были проведены эксперименты по титрованию 3 серий вирусных суспензий. Результаты определения биологической активности и расчетные титры ВБ представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты определения биологической активности и расчетные титры ВБ (с использованием коэффициентов корреляции)

Наименование единиц биологической активности	Титр ВБ и № серии суспензии		
	01	02	03
Опытный в $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{мл}$	$6,83 \pm 0,22$	$6,75 \pm 0,25$	$5,33 \pm 0,14$
Расчетный в $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{мл}$	6,83	6,75	5,33
Опытный в $\lg \text{FFU}_{50}/\text{мл}$	$6,25 \pm 0,00$	$5,92 \pm 0,08$	$4,92 \pm 0,08$
Расчетный в $\lg \text{FFU}_{50}/\text{мл}$	6,15	6,08	4,80
Опытный в $\lg \text{БОЕ}_{50}/\text{мл}$	$7,00 \pm 0,14$	$6,83 \pm 0,17$	$5,25 \pm 0,14$
Расчетный в $\lg \text{БОЕ}_{50}/\text{мл}$	6,76	6,68	5,28
Опытный в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	$4,42 \pm 0,22$	$4,75 \pm 0,25$	$3,33 \pm 0,17$
Расчетный в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$	4,55	4,50	3,55

Из таблицы 2 можно заключить, что расчетные титры суспензий, полученные с использованием корреляционных коэффициентов, находятся в области стандартного отклонения титров ВБ, полученных опытным путем.

Полученные результаты по определению титра ВБ с использованием различных методов, а также требуемые параметры для вирусодержащих суспензий при приготовлении антирабических препаратов свидетельствуют об эффективности всех испытанных систем определения биологической

активности штамм «VRC-RZ2». В тоже время существующие ограничения для каждого из методов, связанные с использованием дорогостоящего оборудования, дополнительных реактивов, большого количества животных или многостадийностью процесса, обуславливают выбор метода титрования ВБ штамм «VRC-RZ2» по ЦПД, как наиболее приемлемого.

Обсуждение

Одним из основных этапов контроля производимой вакцины, по которому дается предварительное

заключение об ее эффективности, является биологическая активность вирусосодержащей суспензии. Анализ литературных данных показывает, что исследователи при определении титра ВБ в культуральных суспензиях используют различные единицы биологической активности, в зависимости от используемого метода [5-7]. При этом в доступной литературе отсутствуют результаты комплексных исследований по корреляции титров ВБ в культуральных суспензиях для разных методов. В тоже время, для корректного сравнения собственных результатов с данными других исследователей, необходимо использовать идентичные методы определения биологической активности ВБ. Учитывая данный аспект, в рамках нашей работы, проведены эксперименты по определению биологической активности ВБ с использованием различных методов.

Анализ литературных данных позволил установить, что репродукция различных вакцинных ВБ в культуре клеток не всегда сопровождается проявлением цитопатического эффекта, то есть данные свойства присущи не всем штаммам вируса [7]. Данное свойство каждого конкретного штамма ВБ является детерминирующим фактором для выбора системы определения биологической активности вирусосодержащих суспензий. Штаммы ВБ, не обладающие цитопатическим эффектом на культуре клеток, также не образуют бляшки на культуральных клетках в агарозном слое [8]. Испытуемый штамм ВБ «VRC-RZ2» проявлял цитопатическое действие при репродукции на культурах клеток, а также образовывал бляшки при инфицировании клеток в агаровом слое, содержащем культуральную среду.

Для штаммов ВБ, не имеющих цитопатического действия на культуры клеток широко используется метод определения биологической активности по фокус формирующим единицам [8]. Данный метод в отдельных источниках описывают как наиболее чувствительный метод определения титра вируса, в других источниках приводятся данные о меньшей точности и чувствительности метода в сравнении с методом бляшек. В наших экспериментах было установлено, что метод фокус формирующих единиц обладал меньшей чувствительностью, чем методы бляшек и биопробы.

Недосеков А.А. приводит данные о корреляции титров ВБ, определяемых на мышах и в культуре клеток ПС и указывает на поправочный коэффициент 1,2 lg. Автор указывает, что если титр ВБ определяемый в культуре клеток по ЦПД будет составлять 5,0 lg ТЦД₅₀/мл, то титр на мышах будет 6,2 lg МЛД₅₀/мл [9]. В представленных в рамках данной работы экспериментах поправочный коэффициент составил 1,5 lg, что по нашему мнению связано с тем, что в наших экспериментах использована культура клеток ВНК-21.

Полученные в ходе экспериментов результаты по корреляции титров вирусосодержащих суспензий с

использованием разных методов определения биологической активности позволили рассчитать коэффициенты, с помощью которых можно получить расчетные титры в необходимых единицах активности. В результате дополнительной серии опытов подтверждено, что данные коэффициенты позволяют с достаточной степенью точности рассчитать титр в необходимых единицах активности.

Анализ результатов исследований позволил сделать заключение, что для определения биологической активности ВБ штамм «VRC-RZ2» может быть использован любой из испытанных методов. Учитывая простоту процедуры и учета результатов метода определения биологической активности ВБ в культуре клеток по цитопатическому действию, сходную с процедурой наработки ВБ, а также отсутствие дополнительных затрат, наиболее приемлемым представляется метод титрования ВБ штамм «VRC-RZ2» по ЦПД.

Выводы

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. В связи с тем, что ВБ (штамм «VRC-RZ2») при репродукции на культурах клеток проявляет цитопатическое действие, то могут быть использованы методы определения биологической активности вируса по ЦПД, а также по бляшкообразующим единицам.

2. С учетом требований к активности вирусосодержащих суспензий при приготовлении антирабических препаратов, каждый из испытанных методов эффективен для определения титров ВБ (штамм «VRC-RZ2»).

3. Полученные в результате исследований коэффициенты корреляции предлагается использовать для получения расчетных титров штамма ВБ «VRC-RZ2» в lg МЛД₅₀/мл, lg ТЦД₅₀/мл, lg БОЕ₅₀/мл, lg FFU₅₀/мл.

4. Наиболее приемлемым методом определения биологической активности ВБ (штамм «VRC-RZ2») является метод титрования по цитопатическому действию на культурах клеток, ввиду простоты его исполнения, учета и интерпретации результатов и отсутствия необходимости в дополнительных расходах на оборудование, реактивы и животных.

Литература:

1. www.minagri.kz
2. www.mz.gov.kz
3. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. - М., «Аквариум», 2001, 304 с.
4. Сливко И.А., Недосеков В.В., Хрипунов Е.М. и др. Изучение условий культивирования и инактивации вируса бешенства // Матер. междунаучно-практ. конф. - Покров, 2001. - С. 68-70.
5. Вуннер В. Культивирование, очистка и титрование рабдовирусов // Вирусология. Методы. Под ред. Мейхи. - Б., «Мир». - С. 112-130.

6. Лаптева О.Г., Горшкова Т.Ф., Жестеров В.И. и др. Инфекционная и антигенная активность вируса бешенства, выращенного в суспензии клеток ВНК-21 // Ветеринария, № 3, 2003. - С. 18-20.
7. Сливко И.А., Недосеков В.В., Хрипунов Е.М. и др. Изучение условий культивирования и инактивации вируса бешенства // Матер. междуна. научно-практ. Конф. - Покров, 2001. - С. 68-70.
8. Культивирование вакцинного вируса бешенства в линиях перевиваемых клеток зеленой маргышки // Вопросы вирусологии, 1995, № 5. - С. 432-433.
9. Недосеков В.В. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бешенства животных и контроля эффективности антирабических вакцин // Тез. докл. матер. междунар. научно-практ. конф. Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов. - Покров, 2003. - С. 47-49.

Рецензент: д.биол.н., профессор Токтосунов А.Т.
