

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

АДАПТАЦИЯ ОРГАНО-ТКАНЕВОГО РАБИЧЕСКОГО ВИРУСА-ФИКС ШТАММ "НИСХИ-МПТ" К ПЕРЕВИВАЕМЫМ КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК

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

ADAPTATION OF ORGANO-TISSUE RABICHESKOGO VIRUS FIX-STRAIN NISKHI-MPT", TO BHK-21 AND MDSK CONTINUOUS CELL LINES ARE SHOWN

УДК 619:578.824.11

В работе приводятся данные по адаптации органо-тканевого штамма вируса-фикс бешенства "НИСХИ-МПТ" к перевиваемым культурам клеток ВНК-21 (почки сирийского хомячка) и МДСК (почки собаки).

Ключевые слова: адаптации, мозг, вирус бешенства, культура клеток, цитопатический эффект, иммунофлуоресценция, электронная микроскопия.

The data on adaptation of the organ tissue rabies virus fix, strain "NISKHI-MPT", to BHK-21 (Syrian hamster kidney) and MDSK (dog kidney) continuous cell lines are shown.

Введение

Бешенство – острое инфекционное заболевание животных всех видов и человека, вызываемое нейротропным вирусом, поражающим нервную систему, клинически проявляется в острой, буйной и тихой паралитической формах [1, 2]. Заболевание регистрируется практически во всех странах земного шара [1, 2, 3].

Возбудитель болезни относится к семейству *Rabdoviridae*, роду *Lissavirus*. Из организма больных животных вирус выделяется со слюной и передается здоровым при укусах [1,3]. Вирус, полученный от больных животных, принято называть “уличным” [1].

Л. Пастер путем многократных пассажей “уличного” вируса через организм кроликов, получил так называемый фиксированный вирус (вирус-фикс). В процессе пассирования на кроликах вирулентность вируса по отношению к ним усилилась, а в отношении к другим животным и человеку, ослабилась.

В настоящее время антирабические вакцины, приготовленные с использованием мозговой ткани, по рекомендации ВОЗ, сняты с производства [1]. Тем не менее, в некоторых странах Южной Америки они выпускаются и применяются. В Казахстане также были разработаны технологии изготовления антирабических вакцин на основе тканевого вируса-фикс бешенства, которые применялись в ветеринарной практике до 2002 г. [4, 5]. Накопленные в литературе данные свидетельствуют о том, что вакцины, изготовленные на основе мозговой ткани животных, даже при условии полной инактивации инфекционности вируса несут в себе возможность тяжелых поствакцинальных осложнений, связанных с наличием в мозге животных миелина [6]. В настоящее время потребность в антирабических препаратах в Республике Казахстан восполняется импортными вакцинами, изготовленными на основе культуральных штаммов вируса бешенства.

По данным зарубежных исследователей тканевой вирус-фикс был адаптирован к перевиваемым культурам клеток ВНК-21, МДСК, ПС и др., из которого изготавливались инактивированные и живые антирабические вакцины [4, 5, 6].

В Республике Казахстан культуральные вакцины против бешенства не производятся. Поэтому возникла необходимость адаптации органо-тканевого вируса-фикс к перевиваемым культурам клеток и разработке технологии изготовления культуральной антирабической вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали: органо-тканевой штамм "НИСХИ-МПТ" рабического вируса-фикс (лиофилизированная 10%-ная суспензия мозга щенка павшего от интрацеребрального заражения вирусом-фикс бешенства) - штамм депонирован в коллекции микроорганизмов НИСХИ МОН РК, перевиваемые культуры клеток ВНК-21 (почки сирийского хомячка, клон 17), МДСК (почки собаки), а также мышат-сосунов 3-5 грамм.

Для освежения вируса мышей заражали интрацеребральным введением тканевого вирусосодержащего материала в дозе 0,02-0,03 см³. Место инъекции тщательно обрабатывали 70% спиртом. За животными вели ежедневное наблюдение. У мышей, находившихся в агональном состоянии, павших (проявивших клинические признаки) и вынужденно убитых (без клинических признаков), брали головной мозг, готовили 10% суспензию на физиологическом растворе, осветляли центрифугированием при 2000 об/мин 20 мин. Полученной суспензией заражали следующую партию мышей и таким образом было проведено 5 пассажей.

Для адаптации тканевого вируса к культурам клеток использовали линии клеток ВНК-21 и МДСК (для стационарного культивирования) различных пассажных уровней. При выращивании культур клеток и получении вирусосодержащей суспензии применяли питательные среды Vero и ПСП с pH 7,6-8,0, сыворотку КРС. Монослой клеток до заражения отмывали питательной средой с ДЕАЕ-декстраном. При инокуляции в пробирки с монослоем культур клеток вносили по 0,15-0,2 см³ 10-20% органо-тканевой суспензии, содержащей вирус-фикс бешенства. После контакта при 37°C клеточный монослой промывали питательной средой или стерильным физиологическим раствором с антибиотиками. Затем в пробирки вносили по 1 см³ питательной среды с pH 7,6-8,0, содержащей 2% сыворотки КРС. Инфици-

рованные клетки инкубировали при 33-37 °С в течение 5-10 сут, в зависимости от состояния клеточного монослоя.

Инфицированные культуры клеток МДСК, ВНК-21 и мазки отпечатки из различных отделов мозга инфицированных животных исследовали методом флуоресцирующих антител (МФА). Контролем служили не зараженные клетки и мазки отпечатки из различных отделов головного мозга здоровых животных. Препараты микроскопировали под люминесценцией в масляной иммерсии. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии учитывали по интенсивности и специфичности флуоресценции исследуемого объекта с учетом структурных особенностей по следующей шкале: + + + + – яркая, сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета; + + + – яркая флуоресценция зеленого цвета; + + – слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета; + – очень слабая флуоресценция неопределенного цвета; – – объект не флуоресцирует. Препарат считали положительным, если в

нескольких полях зрения обнаруживали достаточное количество (не менее 10) типичных гранул с интенсивностью свечения не менее чем в три креста.

Контроль наличия и уровень накопления вируса-фикс бешенства в органно-тканевых и культуральных материалах, также осуществлялся посредством электронной микроскопии (метод негативного контрастирования).

Результаты и обсуждение

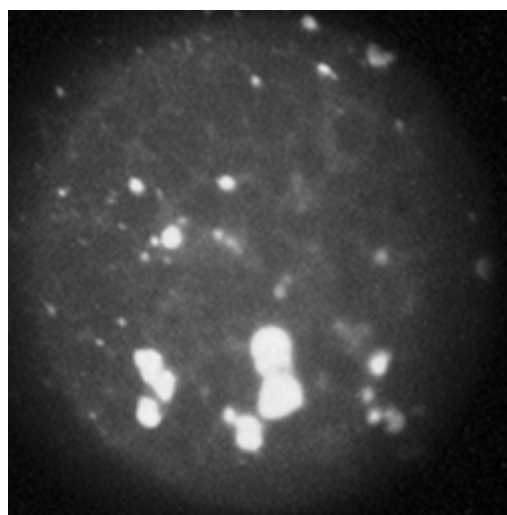
Все подопытные мыши, использовавшиеся для освежения вируса бешенства, инфицированные интрацеребрально мозговыми вирусосодержащими суспензиями, заболели на 3-6 сутки после заражения и болели с признаками паралитической формы бешенства (угнетение, отказ от корма и воды, паралич конечностей). Результаты исследования методом флуоресцирующих антител мазков-отпечатков мозга павших мышей представлены в таблице 1. Из каждого отдела мозга было приготовлено по 3 мазка отпечатка.

Таблица 1

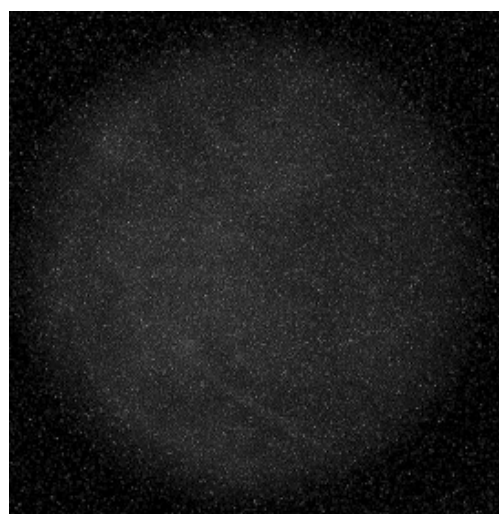
Результаты исследования методом флуоресцирующих антител мазков-отпечатков мозга мышей

Наименование испытуемого материала	№ пассажа	Количество мышей		Результаты исследований		
		в опыте	павших	МФА		
				кора	мозжечок	аммонов рог
Мазки-отпечатки мозга инфицированных мышей	1	4	4	## ## ###	## ## ##	## ## ##
	2	4	4	## ## ##	## ## ##	## ## ##
	3	4	4	## ## ###	## ## ##	## ## ##
	4	4	4	### ### ###	### ### ###	### ### ##
	5	4	4	### ### ###	### ### ###	### ### ##
Мазки-отпечатки мозга здоровых мышей	–	4	–	-----	-----	-----

Как видно из данных представленных в таблице 1, при исследовании в МФА во всех мазках-отпечатках мозга зараженных мышей, обнаружено специфическое свечение изумрудно-зеленого цвета на 3-4 креста гранул различного размера: от мелкого «песка», до крупных конгломератов (рис. 1а). Подобного свечения в препаратах мозга здоровой мыши не наблюдалось (рис. 1б).



а



б

Рисунок 1. Результаты микроскопии мазков отпечатков мозга:

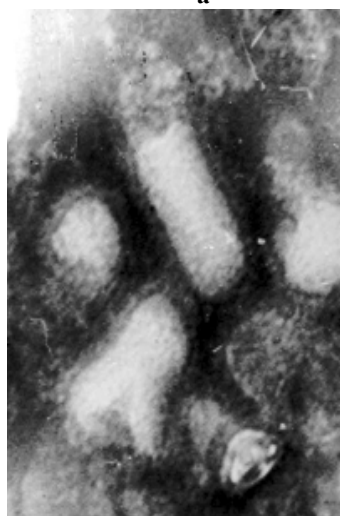
- а - инфицированных мышей (специфическое флуоресцирующее свечение антигена)
- б - intactных мышей (контроль, отсутствие флуоресценции)

Для определения оптимальной дозы заражения животных и культуры клеток определяли титр вируса на белых мышах. Титр вируса в мозговой суспензии 5-го пассажа на мышах составил 5,75 lg MLD₅₀ (MLD₅₀ – 50% мышинных летальных доз).

Отдельные пробы мозговых суспензий павших мышей были исследованы электронной микроскопией. Во всех пробах были обнаружены характерные вирионы бешенства, что отражено на рисунках 2а, 2б.



а



б

Рисунок 2. Электронная микроскопия препаратов из мозга мышей, инфицированных бешенством: а - 1-го пассажа, б - 5-го пассажа. Негативное контрастирование ФВК (ув. 100000×).

Адаптацию вируса в культурах клеток проводили путем слепых перемежающихся пассажей на белых мышах и перевиваемых культурах клеток ВНК-21, МДСК и последовательных пассажей на указанных культурах клеток.

Было проведено 4 перемежающихся пассажа вируса-фикс бешенства на белых мышах и в перевиваемой культуре клеток ВНК-21, МДСК, а затем 15 последовательных пассажей в культуре клеток ВНК-21 и МДСК.

В перевиваемой культуре клеток ВНК-21, инокулированных 10%-ной суспензией мозга мыши (после 2-го последовательного пассажа), наблюдали деструкцию монослоя и дегенерацию клеток, тогда как в контрольных (не инфицированных) культурах таких изменений не было. 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. Поражение клеток, проявившееся на 2-м пассаже, с увеличением пассажного уровня проявлялось все в более ранние сроки. Проявление цитопатического действия (ЦПД) вируса начиналось на 2 сут после инфицирования культур, а на 4-5 сут поражение клеток достигало уже 80% (6-7 пассаж).

В культуре клеток МДСК на 3-4 последовательном пассаже, на 4-е сутки после инфицирования, были обнаружены дегенерационные изменения клеточного монослоя в виде «озер», по краям которых находились крупные клетки, отличающиеся светопреломлением и величиной от остальных клеток монослоя, аналогичных изменений в контролях не отмечалось. Следует отметить, что в последующих пассажах подобных изменений клеточного монослоя не обнаружено.

Для определения специфичности клеточной дегенерации препараты из инфицированных клеток различных пассажных уровней исследовались МФА. Культуры клеток ВНК-21 и МДСК, выращенные на стеклах фиксировали через 24, 48, 72 часа после заражения и красили специфическим иммуноглобулином, меченным ФИТЦ, в рабочем разведении. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии представлены в таблице 3.

Таблица

Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии культуральных препаратов

№ п/п	Наименование материала	Время, час			Результат
		24	48	72	
1	ВНК-21 1 пассаж	## ## ### ###	## ## ### ###	н/и	положительный
2	МДСК 1 пассаж	-- --	-- --	-- --	отрицательный

3	ВНК-21 3 пассаж	### ## ### ##	## # ## +	## # + +	положительный
4	МДСК 3 пассаж	--	--	--	отрицательный
5	ВНК-21 5 пассаж	н/и	н/и	## # ### ##	положительный
6	МДСК 3 пассаж	--	--	--	отрицательный
7	ВНК-21, 7 пассаж	## # + +	## # ## ##	н/и	положительный
8	Контроль, не зараженная МДСК	--	--	--	отрицательный
9	Контроль, не зараженная ВНК-21	--	--	н/и	отрицательный

Из таблицы 3 видно, что во всех исследуемых препаратах, полученных из инфицированной культуры клеток ВНК-21 (по четыре препарата на каждую пробу) было выявлено специфическое свечение от слабой флуоресценции желто-зеленого цвета до ярко зеленого цвета, мелких песчинок, средних и крупных гранул и целых клеток со светящейся цитоплазмой. Во всех препаратах, полученных из инфицированной культуры клеток МДСК, а также в контрольных препаратах специфической флуоресценции не обнаружено.

При электронно-микроскопическом исследовании вирусосодержащей культуральной суспензии 7, 10-го пассажного уровня, полученной в культуре клеток ВНК-21 были обнаружены вирусные частицы пулевидной формы, характерной для вируса бешенства, что отражено на рисунках 5, 6.

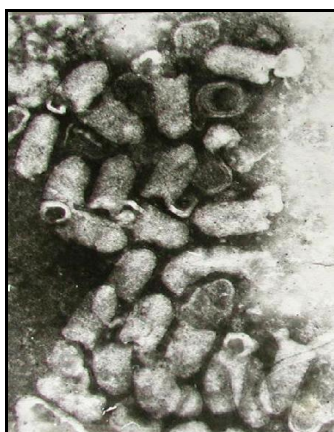


Рисунок 5. Вирионы вируса бешенства в инфицированной культуре клеток ВНК-21 (пассаж 7).
Негативное контрастирование ФВК (ув. 100000×)

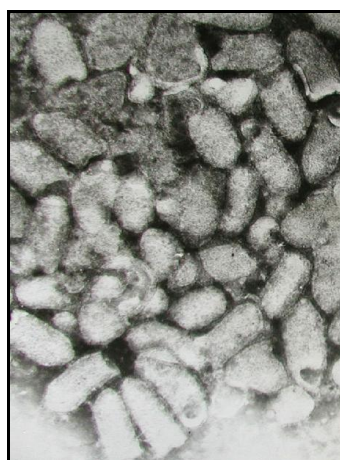


Рисунок 6. Вирионы вируса бешенства инфицированной культуре клеток ВНК-21. Негативное контрастирование ФВК (ув. 100000×)

Таблица 4

Определение биологической активности вируса бешенства на мышах

Наименование испытуемого материала	Разведение	Кол-во мышей в опыте	Кол-во павших мышей	Титр, lg MLD ₅₀ /0,03 см ³
ВНК-21 1 пассаж	10 ⁻³	4	4	4,50
	10 ⁻⁴	4	3	
	10 ⁻⁵	4	1	
	10 ⁻⁶	4	0	
ВНК-21 3 пассаж	10 ⁻³	4	4	5,25
	10 ⁻⁴	4	4	
	10 ⁻⁵	4	3	
	10 ⁻⁶	4	0	
ВНК-21 5 пассаж	10 ⁻³	4	4	5,50
	10 ⁻⁴	4	4	
	10 ⁻⁵	4	3	
	10 ⁻⁶	4	1	
ВНК-21 7 пассаж	10 ⁻³	4	4	5,75
	10 ⁻⁴	4	4	
	10 ⁻⁵	4	4	
	10 ⁻⁶	4	1	
ВНК-21 12 пассаж	10 ⁻³	4	4	6,00
	10 ⁻⁴	4	4	
	10 ⁻⁵	4	3	
	10 ⁻⁶	4	3	

Для контроля репродукции и накопления ВБ в культуре клеток ВНК-21 определяли биологическую активность вируса в культуральных суспензиях различных пассажных уровней на мышатах-сосунах. Результаты определения биологической активности представлены в таблице 4.

Данные таблицы показывают, что с увеличением пассажного уровня происходило повышение репродуктивных свойств вируса-фикс бешенства в культуре клеток ВНК-21. Биологическая активность рабического вируса в культуральной суспензии 12 пассажа составила $6,00 \lg \text{MLD}_{50}/0,03 \text{ см}^3$.

Выводы

На основании результатов МФА и ЭМ при исследовании культуральных препаратов и клинических признаков при интрацеребральном заражении мышей культуральной суспензией вируса следует заключить, что органно-тканевой вирус-фикс бешенства адаптирован к перевиваемой культуре клеток ВНК-21.

Литературы

1. www.minagri.kz
2. Недосеков В.В., Груздев К.Н. Бешенство животных. - Москва, 2001. - С. 49-57.
3. Лобзин Ю.В. Руководство по инфекционным болезням. - С-Петербург, "Фолиант", 2000. - С. 456.
4. Хрипунов Е.М., Жестеров В.И., Евсеева С.Д. и др. Бешенство диких животных, особенности его распространения // Мат. межд. научно-практической конференции. - Покров, 2002. - С. 36-38.
5. Махишев Т.А., Квасов И.Л., Сутбаев С.А. Специфические методы диагностики бешенства // Мат. межд. Конференции. - Семипалатинск, 1999. - С. 157-159.
6. Жестеров В.И., Лаптева О.Г., Горшкова Т.Ф., Бальшева В.И. Культивирование вируса бешенства в суспензии клеток ВНК-21 // Мат. межд. научно-практической конференции. - Покров, 2002. - С. 113-116.
7. Корпусова Т.И., Михалишин В.В., Шипилов В.И. и др. Перевиваемые культуры клеток - тест-система для титрования вируса бешенства // Пробл. инфекц. патологии с.- х. животных. - Владимир, 1997. - С. 173-174.

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