

УДК: 578:57.083

UDC: 578:57.083

НЕКОТОРЫЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ¹

SOME IMMUNOBIOLOGICAL FEATURES OF RIFT VALLEY FEVER VIRUS OF ATTENUATED STRAIN

Балышева Вера Ивановна
д.б.н.

Balysheva Vera Ivanovna
Dr.Sci.Biol.

Капустина Ольга Владимировна
к.в.н.

Kapustina Olga Vladimirovna
Cand.Vet.Sci.

Закутский Николай Иванович
д.в.н.

Zakutskiy Nickolay Ivanovich
Dr.Sci.Vet.

Власова Наталья Никифоровна
д.б.н.

Vlasova Natalia Nikiforovna
Dr.Sci.Biol.

Южук Татьяна Эммануиловна
к.б.н.

Yuzhuk Tatyana Emmanuilovna
Cand.Biol.Sci.

Прудникова Елена Юрьевна
аспирант
*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Российской академии
сельскохозяйственных наук, г.Покров, Россия*

Prudnikova Elena Yurievna
postgraduate student
*State Research Institution National Research Institute
for Veterinary Virology and Microbiology of Russia,
Russian Academy for Agricultural Sciences, Pokrov,
Russia*

В статье представлены результаты изучения культуральных свойств вируса ЛДР, разработки режимов инактивации вируса теотропином, формалином, димером этиленimina. Подобраны инактиванты и оптимальные режимы инактивации, позволяющие получать инактивированное вирусное сырье с сохранением антигенной и иммуногенной активности

The article represents some results of Rift Valley virus culture characteristics, development of conditions for virus inactivation with teotropin, formalin or ethyleneimine dimer. A range of inactivants and optimal inactivation conditions, which provide the production of inactivated raw virus with preserved antigenic and immunogenic activity rates, is selected

Ключевые слова: КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ИНАКТИВАЦИЯ, ВИРУС ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ, АНТИГЕННОСТЬ, ИММУНОГЕННОСТЬ

Keywords: CULTURE, INACTIVATION, RIFT VALLEY VIRUS, ANTIGENICITY, IMMUNOGENICITY

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 11-08-01245-а

Введение

Лихорадка долины Рифт (ЛДР) - зооантропонозная трансмиссивная остро протекающая болезнь с признаками интоксикации, лихорадки, некротического гепатита, геморрагического гастроэнтерита, с высокой летальностью среди ягнят и козлят. Возбудитель относят к семейству Bunyaviridae рода Phlebovirus. В настоящее время ЛДР является объектом пристального внимания исследователей, т.к. является особо опасным зооантропонозом и наносит огромный экономический ущерб, который складывается из потерь от аборт, высокого процента гибели молодняка, резкого снижения продуктивности скота, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, а также на госпитализацию и лечение людей [4].

Эпизоотическое проявление болезни в виде эпизоотических вспышек и эпизоотий имеет место в африканских и азиатских странах. Однако, согласно результатам исследования, проведенных Союзом защиты дикой природы (Wildlife Conservation Society), глобальное потепление повлечет изменение экосистем, привычных для определенных климатических поясов, на другие. В частности, потепление может привести к увеличению числа и распространению потенциальных переносчиков возбудителя болезни ЛДР - комаров *Cx. tritaeniorhynchus* и *Ae. vexans arabiensis*. Имеются сообщения об обнаружении антител в крови шведских солдат из контингента войск ООН. [6]. Все это свидетельствует об угрозе распространения лихорадки долины Рифт в страны, в которых к настоящему времени были свободны от этой болезни [7].

В связи с тем, что применение живых вакцин для профилактики ЛДР связано с потенциальной опасностью (реверсия, рекомбинация с полевыми изолятами), особую значимость приобретают инактивированные вакцины для защиты людей и животных. Производство инактивированных

вакцин связано с наработкой большого количества вирусного сырья с высокой инфекционной активностью [1], в связи с чем, поиск культуральных клеточных систем и разработка оптимальных параметров культивирования вируса всегда имеет важное значение для разработки вакцинных препаратов.

Не менее важным этапом при разработке инактивированных вакцин является инаktivация вирусного сырья, которая должна быть не только эффективной, но и максимально сохраняющей антигенные свойства инактивированного вируса [2,3,5].

Поэтому целью наших исследований являлось изучение репродукции вируса ЛДР в перевиваемых линиях клеток – как наиболее технологичных продуцентов вирусного сырья, выбор инактивантов и отработка режимов инаktivации вируса, обеспечивающих сохранение антигенной и иммуногенной активности инактивированного препарата.

Материалы и методы.

Вирус ЛДР: вакцинный штамм «1974- ВНИИВВиМ» с инфекционной активностью 6,0-6,5 lg ТЦД₅₀/см³ получен из коллекции микроорганизмов ВНИИВВиМ.

Перевиваемые линии клеток почек: сирийского хомячка (ВНК-21/13); эмбриона козы (ПЭАК), теленка (МДВК), зеленой мартышки сайги (ПС), сибирского горного козерога (ПСГК-60), (CV-1), овцы (ПО), эмбриона кролика (ПЭКр-85). Для сравнения эффективности накопления вируса ЛДР в первичных и перевиваемых культурах клеток использовали первичную культуру клеток почки ягненка (ПЯ).

Среда Игла (МЕМ) фирмы Sigma (США), среда 0,25% ФГМ-суспензионная, обогащенная витаминами группы "В" и глутамином (600 мг/дм³) с добавлением 5-10% сыворотки крови КРС; забуференный

физиологический раствор (ЗФР) pH 7,2-7,4; 0,02%-ный раствор версена; 0,25%-ный раствор трипсина, бактериальные среды.

Реактивы: 1,8,3,6-диэндометилен-1,3,6,8-тетразациклодекан (теотропин, А-24), димер этиленимина (ДЭИ), бета-пропиолактон, формалин (36,5% формальдегида), гидроокись алюминия (ГОА, с 6% сухого остатка).

В опытах использовали клинически здоровых беспородных белых мышей: 1-3 дневного возраста, самок массой 18-20 гр, овец в возрасте 6-12 месяцев, массой 35-50 кг.

Вирус выращивали при 34⁰С в статических, роллерных и суспензионных условиях в течение 3-4 суток в зависимости от клеточного субстрата, множественности заражения и условий культивирования. Инфекционную активность вируса определяли по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в lg ТЦД₅₀/см³ или lg MLD₅₀/см³.

Инактивация вируса ЛДР. Работу по подбору инактиванта и оптимальных режимов инактивации проводили с осветленной вирусосодержащей культуральной жидкостью с инфекционной активностью не ниже 8,0 lg MLD₅₀/см³, концентрация белка не превышала 0,5 мг/ см³.

Действие химических препаратов - теотропина, формалина, димера этиленимина на вирус изучали в следующих концентрациях: 0,2%; 0,1%; 0,05%; 0,025%; 0,001% при различных температурах 18-22⁰С, 4⁰С, 37⁰С в течение 24-96 часов при периодическом перемешивании. Константу скорости инактивации вируса (К) рассчитывали по формуле, выражая в час⁻¹ (потеря инфекционной активности вируса за час). Для изучения кинетики инактивации проводили отбор проб через 1, 3, 6, 18, 24, 48, 72 и 96 часов. На основании определения константы скорости инактивации

вируса ЛДР рассчитывали время полной потери инфекционности, которое впоследствии проверяли экспериментально.

Полноту инактивации вируса определяли путем проведения трех последовательных пассажей инаktivированного вируса в элективной культуре клеток, а также путем внутримозгового введения инаktivированного материала мышам 1-3 дневного возраста.

Инфекционную и гемагглютинирующую активности вируса после экспозиции инаktivантов определяли методом параллельного титрования на мышатах 1-3 возраста, в РПГА и РСК через 1, 3, 12, 24, 36, 48, 72, 96 часов после обработки.

Для оценки антигенной и иммуногенной активности инаktivированного вируса использовали белых мышей массой 18-20 гр., овец массой 35-50 кг. Животным вводили инаktivированные препараты внутримышечно дважды с интервалом 14 суток в объеме 0,5 и 2,0 см³, соответственно. У животных для определения титра специфических антител отбирали пробы крови через 14, 21 и 28 суток после прививки, через 28 суток проводили заражение контрольных и вакцинированных животных вирулентным вирусом ЛДР штамм «Энтеббе» внутримышечно в дозе 1000 ЛД₅₀/см³. За состоянием опытных животных вели наблюдение в течение 14 суток.

Результаты исследования и обсуждение.

При культивировании вируса в указанных выше однослойных культурах клеток изучали зависимость накопления вируса ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» от множественности заражения (от 0,01 – 0,000001 ТЦД₅₀/кл), содержания сыворотки КРС в поддерживающей среде, рН, длительности культивирования при стационарном методе выращивания.

Из культуральных сосудов (1,5 л матрасы) с выросшим монослоем клеток удаляли ростовую среду и вносили поддерживающую среду с 2% сыворотки. Множественность заражения составляла 0,01 ТЦД₅₀/кл.

Инфицированную культуру инкубировали до наступления 80-100% ЦПД. В каждой культуре клеток проводили от 3-х до 5-ти последовательных пассажей.

В зависимости от культуры клеток первые признаки ЦПД в первом пассаже появлялись через 24-48 часов после заражения. В процессе последующих последовательных пассажей время проявления ЦПД сокращалось и к 24 часам культивирования отмечалось округление, сморщивание клеток, появление зернистости цитоплазмы, пикноз ядра, гибель клеток и отслаивание их от субстрата. Часть клеток приобретала звездчатую форму и сохраняла цитоплазматические связи в виде отростков с соседними клетками. Максимальные деструктивные изменения наблюдали через 48-72 часа (90-120 CV-1) культивирования.

При одинаковой множественности заражения ($0,01 \text{ ТЦД}_{50}/\text{клетка}$) длительность культивирования вируса составляла от 3 до 7 суток (таблица 1). Дальнейшее увеличение числа пассажей указанных серотипов в испытываемых клеточных субстратах не вызывало существенного увеличения «урожая» вируса. Во всех клеточных культурах, за исключением ПЭКр-85, вирус ЛДР накапливался в пределах от $5,70 \pm 0,21$ до $6,90 \pm 0,14 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В результате исследований установлено, что наряду с клетками ПО высокой вируспродуцирующей активностью обладали клетки ПС. В культурах клеток ВНК-21/13, МДВК и ПСГК-60 титры вируса были на $0,4-0,9 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ ниже, чем в первых двух культурах клеток.

Таблица №1 - ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК К ВИРУСУ
ЛДР ШТАММ «1974-ВНИИВВиМ»

№ п/п	Количество пассажей	Культура клеток	Время развития 80-100% ЦПД	Титр инфекционной активности (MICLD ₅₀ /см ³)
1	4	ВНК-21/13	3-4	6,25±0,15
2	5	ПЭАК	3-4	5,70±0,21
3	4	МДВК	3-5	6,00±0,25
4	3-4	ПС	4	6,90±0,14
5	5	СV-1	3-4	6,50±0,25
6	3-4	ПСГК-60	3-4	6,22±0,17
7	4-5	ПО	4	6,80±0,14
8	4	ПЭКp-85	7	4,17±0,15
9	5	ПЯ	3	6,32±0,14

Множественность заражения в пределах от 0,01 до 0,0003 практически не влияла на урожай вируса и длительность культивирования, которая была в пределах от 60 до 84 часов. Уменьшение множественности заражения (0,00001-0,00003 ТЦД₅₀/кл и ниже) приводило к снижению «урожая вируса» и увеличению сроков наступления полной деструкции монослоя до 4-5 дней.

Таким образом, оптимальной множественностью заражения перевиваемой культуры клеток ПС является 0,01-0,0001 ТЦД₅₀/кл, что позволяет получать вирусосодержащий материал с инфекционным титром 6,81±0,12 lg ТЦД₅₀/см³ через 2,5-3,5 суток культивирования.

Установлено (табл. 2), что в культуре клеток ПС инфекционная и гемагглютинирующая активность вируса на 4-е сутки была значительно выше, чем в других клеточных культурах. Титр ГА-активности вируса, полученного в круговом монослое, в РПГА достигал величины 1:512, что более чем в 10 раз превосходило этот показатель при культивировании вируса ЛДР в культурах клеток ПСГК и ВНК-21. При этом наблюдается

прямая зависимость между титром инфекционной и гемагглютинирующей активностью.

Таблица 2 – НАКОПЛЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОЙ И ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ВИРУСА ЛДР (ШТАММ «1974-ВНИИВВиМ») ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Культура клеток	Способ культивирования			
	Стационарный монослой		Круговой монослой	
	Инф. актив., lg ТЦД ₅₀ /см ³	ГА-актив. в РПГА	Инф. актив., lg ТЦД ₅₀ /см ³	ГА-актив. в РПГА
ПС	6,81±0,12	1:258	7,32±0,17	1:512
ПСГК-60	6,05±0,15	1:16	6,25±0,12	1:32
ВНК-21/13	6,25±0,10	1:16	6,38±0,14	1:32

n=4

Примечание: исходный титр нативного вируса 6,50 lg ТЦД₅₀/см³,
множественность заражения - 0,001 ТЦД₅₀/кл .

Изучение влияния значений рН поддерживающей среды на накопление вируса ЛДР показало, что поддержание рН в период адсорбции на уровне 6,7-6,9 и при дальнейшем культивировании на уровне 7,1-7,5 позволяло увеличить титр вирусосодержащего материала на 0,5-1,0 lg.

При изменении содержания сыворотки в поддерживающей среде от 0 до 10% установлено, что максимальное накопление вируса было в среде с 2% сыворотки крови КРС.

Известно, что снижение температуры культивирования инфицированной культуры обеспечивает стабилизацию рН поддерживающей среды, сохранение антигенной активности вируса и снижение риска реверсии вирулентных свойств штамма вируса. Поэтому нами было изучено влияние понижения температуры инкубирования до 34⁰С на сроки и уровень накопления инфекционной и антигенной активности вируса. Результаты сравнительного изучения динамики и

максимального накопления инфекционной и антигенной активности вируса при температуре инкубирования 37⁰С и 34⁰С не выявили значительных отличий. Однако при температуре инкубирования 34⁰С рН поддерживающей среды изменялась в меньшей степени и не возникало необходимости периодического внесения (каждые 10-12 часов) раствора гидроокиси натрия.

Изучение антигенной активности вирусосодержащего материала, полученного при разных температурах культивирования, показало, что гемагглютинирующая и комплементсвязывающая активности практически не отличались и составляли 1:32-64 и 1:16-32, соответственно. Поддержание рН в пределах 7,2-7,5 в течение 48-72 часов культивирования стационарным методом при 34⁰С обеспечивало максимальное накопление вируса до 6,81±0,12 lg ТЦД₅₀/см³, или 7,5-8,7 lg MLD₅₀/см³.

Культивирование вируса роллерным методом в культурах клеток ВНК-21/13, ПСГК-60 и ПС при отработанных оптимальных параметрах выращивания: скорость вращения – 12-15 об/мин, оптимальная доза заражения 0,01 MLD₅₀/кл., температура – 34⁰С, рН 7,2-7,5 позволяло получать через 48-72 часа вирусное сырье с инфекционной активностью 8,53±0,21 lg MICLD₅₀/см³ и с активностью в РПГА - 1: 64-128, в ТФ ИФА – 1:625-3125. Применение роллерной установки, разработанной во ВНИИВВиМ, для выращивания вируса ЛДР, обеспечивало одномоментно получение 48 л вирусного сырья.

При проведении электронно-микроскопических исследований инфицированных культур клеток показано, что в области контакта вирусных частиц с клетками происходит утолщение клеточной мембраны и ее прогиб. Уже через 10 минут адсорбции при 37⁰С происходит частичное слияние клеточной мембраны с оболочкой вируса. Так же в период адсорбции обнаруживали вирусные частицы во внутриклеточных

вакуолях. Установлено, что большинство чувствительных клеток инфицируются в период адсорбции вируса.

Выявление антигенов вируса в процессе его репродукции проводили непрямой методом флуоресцирующих антител, непрямой и прямым методом ИФА на монослое с использованием специфической к ЛДР и контрольной сывороток овец, моноклональных антител к нуклеопротеину (NP) вируса ЛДР.

Показано, что уже через 6-9 часов после заражения культуры клеток удается выявить антигены вируса, в частности NP, в перинуклеарной зоне цитоплазмы в виде отдельных гранул, увеличение числа которых пропорционально сроку культивирования. Через 30 часов инкубирования антиген выявляется по всей поверхности цитоплазмы практически в 50% инфицированных клеток.

В результате проведенных экспериментов установлено, что через 3 часа инкубации при 37⁰С и конечной концентрации инактивантов 0,06% - 0,02% инфекционность вируса резко снижается - на 4,7 lg ТЦД₅₀/см³. Через 24 часа после экспозиции вирус не обнаруживали в большинстве отобранных проб. Учитывая данные литературы, что инаktivация при более низких температурах, чем 37⁰С способствует лучшему сохранению антигенных свойств вируса, динамику инаktivации изучали при 18-22⁰С и 4⁰С. Было установлено, что при воздействии формалина и бета-пропиолактона отмечается быстрое снижение инфекционной активности, затем последующее замедление процесса инаktivации.

При воздействии ДЭИ и А-24 было отмечено более постепенное, приблизительно одинаковое снижение инфекционности до полной ее потери через 48 часов. Однако, полная инаktivация оставшегося вируса, инфекционная активность которого ниже 1 lg ТЦД₅₀/см³, не всегда может быть обнаружена при титровании в результате случайного отбора проб, особенно при работе с большими объемами вирусного материала.

Учитывая, что результаты инактивации вируса ЛДР в дальнейшем могут быть использованы для приготовления инаktivированной вакцины, время экспозиции вирусного материала с инаktivантами увеличили до 3 суток.

Окончательный выбор инаktivанта был сделан после проведения опытов по изучению действия перечисленных инаktivантов на антигенную активность вируса. Следует отметить, что воздействие на вирус ЛДР формалином или бета-пропиолактоном в конечной концентрации 0,2% вело к снижению его гемагглютинирующей и комплементсвязывающей активности. Препараты, инаktivированные ДЭИ и А-24, при температуре 18-22⁰С, времени экспозиции 72-96 часов и конечной концентрации ДЭИ – 0,06%, А-24 – 0,1% сохраняли гемагглютинирующую и комплементсвязывающую активность.

Для оценки антигенных и иммуногенных свойств инаktivированные ДЭИ и А-24 препараты вводили мышам и овцам и на 21-28 сутки после инокуляции отбирали пробы крови для определения комплементсвязывающих и гемагглютинирующих антител в сыворотках крови животных. Титр комплементсвязывающих антител составлял 1:256-512, гемагглютинирующих – 1:512-1024, титр вирусспецифических антител в ТФ ИФА – 1: 125-625.

Эффективность экспериментального образца инаktivированной А-24 ГОА-сапониновой вакцины проверяли на овцах по уровню накопления ВН-антител.

Установлено, что двукратная прививка образцами инаktivированной вакцины индуцировала у привитых овец высокий уровень вируснейтрализующих антител, равный 1:10 -1:64. Привитые животные были устойчивы к контрольному заражению вирулентным штаммом вируса в дозе 1000 ЛД₅₀.

Заключение.

Таким образом, полученные результаты исследований показали, что вирус ЛДР штамм «1974- ВНИИВВиМ» накапливается в перевиваемых культурах клеток ПС, ПСГК-60, MDBK в высоких титрах инфекционной ($8,53 \pm 0,21 \lg \text{MICLD}_{50}/\text{cm}^3$) и антигенной (в РПГА - 1: 64-128) активности. Подобраны инактиванты и оптимальные режимы инаktivации, позволяющие получать инаktivированное вирусное сырье с сохранением антигенной и иммуногенной активности.

Штамм «1974- ВНИИВВиМ» и полученные результаты исследований могут быть использованы для изготовления эффективной безопасной инаktivированной вакцины против ЛДР.

Литература

1. Балышева, В.И. Клеточные культуры в биотехнологии производства инаktivированных вакцин / В.И. Балышева, А.А. Кошелева, В.И. Жестерев // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных: Мат. междунар. науч.-произв. конф., посвященные 100-летию Авророва. /- Воронеж, 22-23 июня 2006. – С.1027- 1030
2. Гард, С. Химическая инаktivация вирусов / С.Гард // Природа вирусов.- М., 1958. – С. 135-157.
3. Доел, Т.Р. Инаktivация вирусов, продуцируемых в культурах клеток животных / Т.Р. Доел // Биотехнология клеток животных. - М.: ВО Агропромиздат, - 1989. - Т. 2.- С. 518.
4. Кнize, А.В. Эволюция эпизоотической ситуации по лихорадке долины Рифт./ А.В. Кнize, Н.В. Дмитренко, А.А. Стрижаков // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропоознозов: труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию института 24-26 сентября ГНУ ВНИИВВиМ.-Покров, 2003. Часть1.-С.93-98.
5. Сергеев, В.А. Вирусные вакцины /В.А. Сергеев. – Киев: Урожай, 1993.- 370 с.
6. Meegan, J. M. Rift Valley fever: / Meegan, J. M., Bailey C.L. // The Arboviruses: Epidemiology and Ecology.- 1989.- vol.4, Monath T.P., ed. CRC Press, Boca Rationh, Florida, USA, 52-76.
7. The Deadly Dozen: 12 Diseases Global Warming Incubates / From Lyme Disease to Ebola Virus, The World Is Getting Sicker // - [Электронный ресурс]. – 2008.- Режим доступа: <http://www.thedailigreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-wamming-47100803#ixzz1UdUAav4g>.