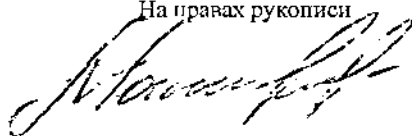


На правах рукописи



Малкин Геннадий Андреевич

Особенности размножения хантавирусов в культурах клеток

03.02.02 - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2015



005570532

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Дзагурова Тамара Казбековна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова»,
заместитель директора по научной работе

**Юминова
Надежда Васильевна**

доктор медицинских наук, профессор,
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения» Минздрава
России, главный эксперт

Воробьева Мая Сергеевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалея» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 19 июня 2015 г. в 12 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 001.026.01 на базе ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова» по адресу: 142782, город Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км. Киевского шоссе.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова» и на сайте <http://poliomyelit.ru>.

Автореферат разослан « 6 » июня 2015 г.

Учелый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Романова Лидия Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место среди природно-очаговых инфекций в России. Возбудители этой инфекции в составе рода *Hantavirus* входят в семейство *Bunyaviridae*. К настоящему времени доказана этнологическая роль четырех хантавирусов в структуре заболеваемости ГЛПС: в европейской части России и странах Европы – вирусы Пуумала (ПУУ) и 3 генотипа вируса Добrava/Белград (ДОБ); в российских регионах Дальнего Востока и странах Азии – вирус Хантаан (ХТН) и его подтип Амур и вирус Сеул (СЕУ). Таким образом, под одним названием «ГЛПС» регистрируются, по крайней мере, четыре этнологически самостоятельных хантавирусных инфекций. Естественными хозяевами хантавирусов являются грызуны и насекомоядные, в организме которых вирус длительное время коэволюционировал. Хантавирусы с трудом адаптируются к размножению в организме лабораторных животных, а также в клеточных культурах, что вероятно объясняет более чем тридцатилетний период безуспешных попыток изолировать возбудитель ГЛПС, вирусная природа которого уже была доказана. Возможность использования клеточных культур для культивирования хантавирусов стала активно изучаться после успешной адаптации вируса Хантаан, изолированного на лабораторных мышах, к культуре клеток карциномы легких человека, А549.

Ввиду отсутствия лабораторных животных, чувствительных к размножению подавляющего большинства хантавирусов, клеточные культуры приобретают особо важное значение для выделения и культивирования хантавирусов, изучения их патогенеза *in vitro*, генетических, антигенных и других таксономических характеристик, а также для конструирования диагностических и вакцинных препаратов. В то же время, хантавирусы, как и большинство представителей семейства *Bunyaviridae*, плохо адаптируются к размножению в клеточных культурах, характеризуются длительным циклом

репликации, отсутствием цитопатического эффекта, имеют прочную внутриклеточную ассоциацию, низкий уровень накопления вируса в культуральной жидкости. Спектр изученных клеточных культур, используемых для размножения хантавирусов, весьма ограничен. Несмотря на многочисленные исследования, подбор клеточной культуры пригодной в качестве субстрата для производства вакцин против ГЛПС, остается одной из актуальных проблем. В особенности это касается вакцины на основе вируса Пуумала вследствие низкого уровня репродукции его в культуре клеток. Вместе с тем, получение высокоурожайного вирусного субстрата является принципиально важной основой для создания убитых цельновирионных вакцин против ГЛПС. К настоящему времени инактивированные хантавирусные вакцины производятся в Китае, КНДР и Южной Корее на основе вирусов Хантаан и Сеул, но они не обладают защитным действием против вируса Пуумала – основного возбудителя ГЛПС у жителей европейской части России, на которую приходится более 98% всей заболеваемости, регистрируемой в России.

Степень разработанности темы исследования

К началу нашей работы не проводились систематические исследования, касающиеся оптимизации условий получения вирусного (Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан и Сеул) субстрата для инактивированных вакцин против ГЛПС. Отсутствовала информация о сравнительной эффективности известных лабораторных методов выявления инфекционной активности хантавирусов в клеточных культурах, как основы для разработки методов контроля безопасности вакцины. Несмотря на то, что морфологические характеристики вируса Пуумала, очищенного из суспензии легких спонтанно инфицированных рыжих полевок, были определены еще в 1982 г., данных, характеризующих морфологию вируса Пуумала адаптированного к размножению в клеточных культурах, в доступной литературе не имелось. По-прежнему ограниченным остается спектр клеточных культур, разрешающих

эффективную репликацию патогенных хантавирусов. Все вышесказанное определяет актуальность и значимость настоящего исследования.

Цель и задачи исследования

Цель данной работы – уточнение спектра перевиваемых линий клеток, способных поддерживать размножение хантавирусов, вызывающих ГЛПС (ПУУ, ХАН, СЕУ, ДОБ), выявление наиболее перmissive клеточной культуры и условий эффективной репликации в них хантавирусов, включая изоляцию штаммов от природных носителей.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку эффективности лабораторных методов для выявления инфекционной активности хантавирусов при культивировании в клеточных культурах (МФА, ИФА, МФОЕ, ОТ-ПЦР).
2. Провести адаптацию вирусов Пуумала и Добрава/Белград к размножению в клеточных культурах различного происхождения.
3. Определить динамику размножения и оптимальные сроки накопления вирусов ПУУ, ХАН, СЕУ, ДОБ в культуральной жидкости и в клетках наиболее permissive клеточных культур.
4. Оптимизировать условия получения вирусного субстрата (ПУУ, ХАН, СЕУ, ДОБ), пригодного для использования при изготовлении цельновирионной инактивированной вакцины против ГЛПС.
5. Изолировать хантавирусные штаммы в культуре клеток и провести их идентификацию.
6. Исследовать морфологические характеристики вируса Пуумала, а также культуры клеток при репликации в ней вируса, по результатам электронной микроскопии.

Научная новизна

Получены приоритетные данные в изучении биологии возбудителей хантавирусных лихорадок у нас в стране и за рубежом. Впервые показана возможность адаптации патогенных хантавирусов Пуумала и Добрава/Белград

к размножению в не свойственной им биологической системе - перевиваемых клетках, полученных из почки овцы и почки теленка, что открывает возможности дальнейшего изучения вопросов, связанных с преодолением видового барьера, вирусной трансмиссии и экологии хантавирусов. Впервые установлено, что вирионы вируса Пуумала по форме и размерам значительно отличаются от аналогичных характеристик других патогенных хантавирусов, но имеют сходство с морфологией близкородственного непатогенного вируса Тула. Установлено, что штаммы, представляющие вирусы Пуумала, Хантаан, Сеул, а также генотипы Добрава/Сочи и Добрава/Куркино отличаются по размеру и форме фокусов, образуемых в культурах Vero и Vero Еб, что позволяет рассматривать эти различия как отличительный фенотипический признак.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлены закономерности размножения вирусов, возбудителей ГЛПС, в перmissive клеточных культурах, определены оптимальные условия сбора вирусного урожая. Штаммы вирусов-возбудителей ГЛПС адаптированы к размножению в клеточных культурах, разрешенных для производства вакцин вводимых людям. Предложены методы контроля остаточной инфекционной активности инактивированной вакцины на основании сравнительной оценки эффективности методов индикации хантавирусов в культуре клеток. Уточнена морфология вирионов хантавируса Пуумала, адаптированного к размножению в клеточных культурах, что имеет практическую значимость для усовершенствования методов концентрирования и очистки вирусосодержащих препаратов.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований использованы при создании лабораторных серий вакцины против ГЛПС, а также при составлении научно-технической документации на вакцину.

В Государственной коллекции вирусов депонированы 2 штамма,

представляющие генотипы Добрава/Сочи и Добрава/Куркино, выделенные в культуре Vero E6 от кавказской лесной мыши и от полевой мыши, соответственно.

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно проведен обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме, обобщены результаты исследований и подготовлены материалы к публикациям. Самостоятельно выполнены все эксперименты по изучению хантавирусов в клеточных культурах, выделению и идентификации вирусных штаммов и их типированию. Совместно с сотрудниками лаборатории патоморфологии вирусных заболеваний выполнены электроно-микроскопические исследования.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования послужила совокупность вирусологических, серологических, молекулярно-биологических и электроно-микроскопических методов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Определена эффективность применения различных методов индикации размножения патогенных хантавирусов в клеточных культурах (выявление вирусного антигена, инфекционного вируса и вирусной РНК).
2. Впервые показана возможность репликации вирусов Пуумала и Добрава в клетках переносимых линий почки овцы и почки теленка.
3. Установлено, что после 3-5 последовательных пассажей штаммов хантавирусов Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан и Сеул в культуре VERO уровень накопления этих вирусов в культуральной жидкости соответствуют таковому в культуре Vero E6.
4. Определена динамика накопления вирусов Пуумала, Добрава/Белград, Хантаан и Сеул в перmissive клеточных культурах в зависимости от множественности заражения (МЗ), времени контакта, присутствия белковых компонентов в среде поддержки.

5. В культуре Vero E6 изолированы штаммы 2-х генотипов вируса Добрава/Белград, проведено их иммунотипирование.
6. Выявлено, что ФОЕ, образующие штаммами вирусов Пуумала, Хантаан, Сеул, а также генотипов Добрава/Сочи и Добрава/Куркино в культурах VERO и Vero E6 имеют различия по размеру и очертаниям, что позволяет рассматривать их как отличительные фенотипические признаки.
7. Представлены морфологические характеристики вируса Пуумала в культуре VERO.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных в ходе работы данных обеспечивается представительностью и достоверностью анализируемых выборок, проведением экспериментальной части работы на сертифицированном оборудовании, определяется достаточным числом исследований, длительным сроком наблюдений, комплексным подходом к проведению исследований, выполненным с использованием современных методов и статистической обработкой полученных результатов.

Материалы исследования доложены и обсуждены на: конференциях молодых ученых ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова 2011, 2012, 2013, 2014 гг; X съезде Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 12-13 апреля 2012 г; IX Международной конференции по проблемам ГЛПС, ХПС и хантавирусам, Пекин, Китай, 2013.

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 1 - в зарубежном журнале, индексируемом в международных библиографических базах, 5 публикаций в российских журналах, входящих в Перечень рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК, а также 1 монография.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста, состоит из введения, основной части (обзор литературы, собственные исследования), заключения, включая выводы, а также списка сокращений, списка литературы,

содержащего 104 источника, иллюстрирована 11 таблицами и 22 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

I Материалы и методы исследований

1.1 Клеточные культуры

Vero E6 – (ATCC No. CRL-1586) клош Vero C1008 культуры Vero. Получена из Каролинского Института, Швеция, на 108 пассаже.

VERO – (ATCC CCL-81) перевиваемая культура клеток почки зеленой мартышки. Получена от ВОЗ (WHO Vero cell bank from ECACC, Accession number 991042), сертифицирована для производства инактивированных вакцин в РФ.

4647 - линия перевиваемых клеток почки взрослой зелёной мартышки. сертифицирована для производства инактивированных вакцин в РФ.

455 - линия перевиваемых клеток селезенки взрослой зеленой мартышки.

4184 - линия перевиваемых клеток почки эмбриона овцы.

ИТ-1 - линия перевиваемых клеток почки теленка.

Культуры клеток 4647, 455, 4184 и ИТ-1 из коллекции ИПВЭ им. М.Л.Чумакова (Л.Л.Миронова и др. 2000).

1.2 Вирусы

В работе использованы вирусы из коллекции лаборатории геморрагических лихорадок, изолированные и поддерживаемые в пассажах в культуре Vero E6: Пуумала (ПУУ), шт. K27/ Уфа-85, ТКД/Уфа-97; Хангаан (ХТН), шт. P-88/ Хабаровск-89; Сеул (СЕУ), шт. SR-11; Добрава/Белград (ДОБ) – генотипы ДОБ/Куркино, шт. ЕАТ/ Липсцк-07 и ДОБ/Сочи, шт. Ар 1584/Сочи-01.

1.3 Иммуные сыворотки и моноклональные антитела

Иммуные сыворотки крови больных и реконвалесцентов ГЛПС, иммуные сыворотки крови лабораторных животных, а также моноклональные антитела из коллекции лаборатории геморрагических лихорадок.

1.4 Серологические методы

Для выявления антител в сыворотках крови мышевидных грызунов, для

определения антигенов хантавирусов, для определения количества накапливаемого в клетках и культуральной жидкости вируса использовали серологические методы (метод непрямой иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ, метод индикации - фокусобразующих единиц, реакция нейтрализации), описанные ранее (Дзагурова с соавторами, 2008).

1.5 Изоляция хантавирусных штаммов

Материал для заражения брали от грызунов у которых по результатам предварительного исследования были выявлены антитела и/или хантавирусный антиген. В качестве инокулята для заражения культуры клеток использовали 10 % суспензию люточной псаии грызунов. При обнаружении специфического антигена в клетках проводилось дальнейшее пассирование инфекционного материала для закрепления штаммов в пассажах.

1.6 Индикация микоплазм в культуре клеток методом ПЦР

Контроль клеточных культур на наличие в них микоплазм осуществляли методом полимеразно-цепной реакции, используя готовые наборы (Indicating FTA EluteMicroCard, 1 sample area per card. Productcode: WB120411) по методике производителя.

1.7 Санация клеточных культур ПТ-1 и 4647 от микоплазменной контаминации

Для освобождения клеток от микоплазменной инфекции использовались антибиотики широкого спектра действия: VM-C-1 (на основе антибиотика Tifmutin) и VM-C-2 (на основе антибиотика Minocycline), а также Эпросент – антибиотик, ингибирующий активность фермента ДНК-гиразы. Эти препараты применяли последовательно поочередно на протяжении 7-8 пассажей.

1.8 ОТ-ПЦР

ОТ-ПЦР осуществляли согласно методике В.Клепра (Klempa et al., 2008).

1.9 Методы электронной микроскопии

Для морфологической характеристики хантавирусов использовали метод электронной микроскопии. Ультратонкие срезы были приготовлены из фиксированных глютаральдегидом зараженных клеток Vero E6.

1.10 Статистические методы

При статистическом анализе материалов оценивались: средние- арифметические и среднегеометрические показатели, средние квадратические отклонения, погрешности средних величин. Достоверность различий выборочных совокупностей оценивали по критериям Стьюдента-Фишера и Вилкоксона. Достоверность их корреляции определяли по коэффициенту корреляции (Гублер и Генкин, 1973).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 2 Репликация патогенных хантавирусов в клеточных линиях различного происхождения

2.1 Сравнительная оценка эффективности методов индикации размножения хантавирусов в клеточных культурах

Для выяснения степени чувствительности способов детекции размножения вируса в клеточных культурах было проведено сравнение методов, основанных на выявлении вирусного антигена с помощью МФА и ИФА, по индикации инфекционного вируса методом титрования ФОВ, а также по определению вирусной РНК методом ОТ-ПЦР. В таблице 1 обобщены результаты индикации размножения штамма вируса ДОВ/Сочи в культуре Vero E6.

На модели вирусов ДОВ/Сочи и Пуумала показано, что методом непрямой иммунофлюоресценции антиген содержащие клетки (КЛ) можно было наблюдать через 24 часа после заражения культуры, тогда как методом ИФА антиген обнаруживался спустя 96 часов после заражения. Вторым по чувствительности явился метод титрования вируса по ФОВ: инфекционный вирус обнаруживался в культуральной жидкости (КЖ) и лизате КЛ культуры Vero E6 при зараженности более 25% клеток. Вирусная РНК определялась при титре вируса более 3,5 lg ФОВ/мл. Похожие результаты были получены и для вируса Пуумала, штамм К-27/Уфа-85.

Таким образом, на ранних сроках размножения наиболее чувствительным методом для выявления хантавирусов в клеточных культурах является индикация внутриклеточного антигена методом непрямой иммунофлюоресценции. В

зависимости от множественности заражения инфицированные клетки выявлялись через 24 –48 часов после заражения. В культуральной жидкости определение вируса по ФОЕ возможно при достижении более 30% зараженности клеток.

Таблица 1- Индикация размножения вируса ДОБ/Сочи, шт. Ар1584/Сочи-01 в культуре Vero E6

| Часы после заражения | Пробы* | ФОЕ | ИФА** | ПЦР | МФА |
|----------------------|--------|------|-------|------|--------|
| 24 | КЛ | отр. | отр. | н/и | ед.кл. |
| 48 | КЛ | отр. | отр. | отр. | 10-15% |
| 72 | КЖ | 3,1 | отр. | отр. | |
| | КЛ | 3,5 | отр. | отр. | 25-30% |
| 96 | КЖ | 3,6 | отр. | + | |
| | КЛ | 4 | + | + | 50-60% |
| 120 | КЖ | 4,4 | + | + | |
| | КЛ | 4,6 | + | + | 75-80% |
| 144 | КЖ | 4,7 | + | + | |
| | КЛ | 5,2 | + | + | 90-95% |

Примечание: * КЛ – клетки; КЖ – культуральная жидкость;

** ИФА выполнен с использованием тест-системы «ХАНТА-N».

Вирусная РНК выявляется в клетках методом ОТ-ПЦР при наличии инфекционного вируса в титре $\geq 3,0 \lg$ ФОЕ/мл, а в КЖ $\geq 3,5 \lg$ ФОЕ/мл. Иммуноферментным методом хантавирусный антиген определяется в КЖ/КЛ на 4 сутки при титре вируса $\geq 4 \lg$ ФОЕ/мл. После 6 суток антиген определяется в 50% проб при более низких титрах инфекционного вируса (в диапазоне 2,1- 3,0), что, по-видимому, связано с избыточной продукцией N белка в процессе репликации вируса.

Исходя из этих данных, в дальнейших опытах, при оценке чувствительности той или иной клеточной линии к размножению хантавирусов, были применены методы индикации вирус специфического антигена МФА и инфекционного вируса по титрованию ФОЕ.

2.2 Адаптация хантавирусов к размножению в клеточных культурах различного происхождения

Известно, что размножение патогенных хантавирусов не подавляется альфа интерфероном, и именно это свойство отличает их от непатогенных хантавирусов (Geimonen et al., 2002). Исходя из этого, теоретически любая клеточная культура, а не только Vero E6, являющаяся дефектной по выработке альфа интерферона, может поддерживать размножение патогенных хантавирусов в случае преодоления видового барьера. В экспериментах по адаптации вируса использовали пассажи зараженных культур, а также пассажи вируса из лизата КЛ и ЮЖ инфицированных культур клеток.

Эксперименты показали, что после 3-4 последовательных пассажей в культуре VERO размножение вирусов Пуумала и Добрава/Белград поддерживается на уровне перmissiveной клеточной культуры Vero E6.

В культуре 4647 после 2-3 пассажей как вируса Пуумала, так и Добрава/Белград, зараженность клеток соответствовала таковой в перmissiveной культуре – т.е. около 100%, однако титр вируса в культуральной жидкости на протяжении 8 последовательных пассажей оставался на 0,8-1,3 Ig ФОЕ/мл ниже, чем в культуре VeroE6. Таким образом, отечественная культура клеток зеленой марьяшки, сертифицированная для производства вакцины, оказалась менее чувствительной к размножению хантавирусов - возбудителей ГЛПС, по сравнению с перmissiveной культурой – Vero E6.

Еще более низкий уровень размножения вирусов Пуумала и Добрава/Белград отмечен в культуре клеток селезенки взрослой зеленой марьяшки – 455. Максимальная зараженность клеток как вирусом Пуумала, так и Добрава не превысила 60 %, а титр вируса не достигал 4 Ig ФОЕ/мл через 8 пассажей в этой культуре. Следует отметить, что на первом пассаже обоих вирусов зараженными были лишь единичные клетки, тогда как в культуре 4647 уже на первом пассаже зараженность клеток составляла около 70 %. На втором пассаже вирусов Пуумала и Добрава/Белград в культуре 455 антиген содержащими были около 40 % - 50 % клеток, однако интенсивность свечения была слабой, что указывает на низкий уровень репликации вирусспецифических белков; вирус в культуральной жидкости не определялся. В дальнейшем, на 7 и 8 пассажах

зараженность клеток не превысила 60 %, а титр внеклеточного вируса – 3,2 lg ФОЕ/мл. Динамика накопления вируса Добрава/Белград в культуре 455 характеризовалась колебанием количества антигенсодержащих клеток со 2-го по 8-й пассажи от 40 до 60%, при этом инфекционный вирус в КЖ определялся на последних двух пассажах с максимальным титром 3,6 lg ФОЕ/мл.

В культуре клеток почки эмбриона овцы, 4184, оба хантавируса размножались слабо на протяжении 8 последовательных пассажей как инфицированной культуры, так и при заражении монослоя лизатом инфицированных клеток. Количество клеток, инфицированных вирусом Пуумала, не превышало 20 %, вирусом Добрава/Белград – 40 % со слабой интенсивностью свечения антигена; инфекционный вирус в КЖ оставался на неопределяемом уровне.

В культуре клеток почки телянка, ПТ-1, максимальная зараженность вирусом Пуумала составила 45 %, титр вируса в КЖ – около 2 lg ФОЕ/мл; максимальная зараженность вирусом Добрава/Белград составила 75 %, титр вируса в КЖ – 2,3 lg ФОЕ/мл. В отличие от культуры 455 и особенно 4184, в клетках ПТ-1, инфицированных как вирусом Пуумала, так и Добрава/Белград (оба генотипа), антиген интенсивно накапливался, что выражалось ярким гранулярным свечением в цитоплазме при исследовании МФА с гомологичными сыворотками. Практическим выходом адаптации вирусов Пуумала и Добрава/Белград к культуре ПТ-1 было изготовление лабораторной серии антигенов для МФА. Такие антигены позволяют более точно отсекаать ложноположительные результаты при контроле сывороток крови мышей, иммунизированных вакцинными препаратами, для которых субстратом размножения вирусов были клетки Vero E6 или VERO.

Таким образом, впервые была установлена возможность адаптации хантавирусов Пуумала и Добрава/Белград, изолированных в культуре клеток Vero E6, к размножению в перевиваемых клетках почки овцы и почки телянка. Несмотря на то, что к 8 пассажиру уровень размножения вирусов в этих культурах не достиг такого в клетках Vero E6, факт репликации этих вирусов в новой биологической среде открывает возможности дальнейшего изучения вопросов, связанных с преодолением видового барьера, вирусной

трансмиссия и экология хантавирусов. Эти результаты косвенно подтверждают факт неоднородности хантавирусной популяции, наличие в ней «квазивидов», способных узнавать и связываться с лигандами (в3 интегринны) другой видовой специфичности. Кроме того, эти исследования показали большую консервативность вируса Пуумала, сравнительно с вирусом Добrava/Белград, при адаптации к размножению в новой биологической среде, что согласуется с предыдущими наблюдениями о более низкой эффективности изоляции в культуре клеток хантавирусов, эволюционно связанных с грызунами подсемейства Хомяковых (в том числе вирус Пуумала), по сравнению с вирусами, ассоциированными с грызунами подсемейства Мышиных (Хангаан, Сеул и Добrava/Белград) (Иванов Л.И. и др., 2000).

2.3 Динамика размножения хантавирусов в клетках наиболее перmissive клеточных культур

2.3.1 Определение оптимальной множественности заражения

На модели вирусов ПУУ, ДОБ, ХТН и СБУ были определены оптимальные условия, способствующие накоплению максимального вирусного урожая. Множественность заражения (МЗ) является одним из факторов, влияющим на накопление вируса. В экспериментах на монослой культуры, выращенной в 1 л роллерах, вносили по 20 мл КЖ с различным содержанием вируса. Через 1 час контакта инокулят сливали и вносили среду поддержки. После 4 суток инкубации при 37 °С ежедневно делали полную смену среды (с понедельника до пятницы) и также далее с понедельника до пятницы (4–15 сутки).

Были выявлены общие закономерности, указывающие на зависимость времени максимального накопления вируса в КЖ от МЗ, а именно: вместе с уменьшением МЗ увеличивается время, в течение которого титр вируса в КЖ достигает значений от 5,2 lg ФОЕ/мл и более. При низких МЗ (менее 0,001) не достигает 5 lg ФОЕ/мл.

На примере вируса Пуумала было проведено исследование по определению оптимальной множественности заражения с использованием большой выборки данных (по 10–15 повторов на каждый вариант МЗ). Основываясь на предыдущем опыте получения вакцинного препарата, нижняя планка содержания вируса в КЖ, была установлена на уровне 5,2 lg ФОЕ/мл.

Для заражения использовали КЖ клеток VERO с содержанием вируса Пуумала, шт.К-27/Уфа-85 в титре, обеспечивающем МЗ в диапазон от 1,5 до 4 (I), от 0,02 до 1(II) и от 0,0005 до 0,0001 (III) ФОЕ/кл.

При МЗ-I вирус накапливался в течение короткого времени и уже на четвертые сутки количество вируса в культуральной жидкости достигало $5 \pm 0,3$ lg ФОЕ/мл, а на пятые сутки – своего максимального значения ($5,8 \pm 0,4$). Однако, несмотря на достаточно высокие показатели накопления вируса в КЖ в ранние сроки, период сбора вирусного урожая, не продолжителен: всего 2-3 дня из-за резкого снижения титра вируса в сборах КЖ в последующие сутки.

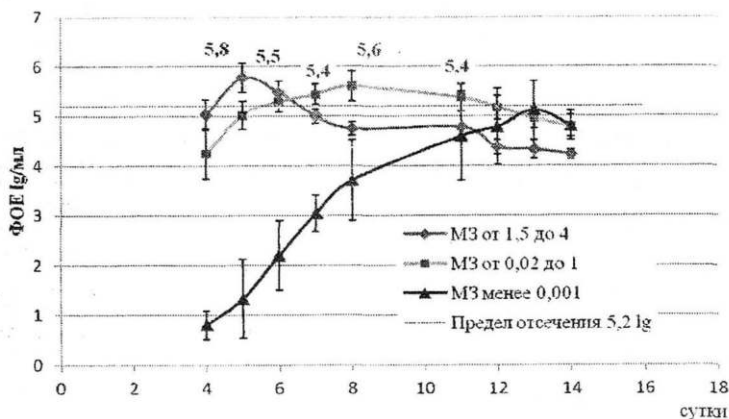


Рисунок 1 – Определение оптимальной множественности заражения при пассировании вируса Пуумала в культуре клеток VERO.

При МЗ-II титр вируса превышал отметку в 5 lg ФОЕ/мл ($5,3 \pm 0,3$) немного позже, на 5-6 сутки, но при этом, с небольшими колебаниями, длительно оставался на уровне $5,4 \pm 0,2$ lg ФОЕ/мл, что позволяет увеличить период ежедневного сбора вирусного урожая до 6-7 суток.

При МЗ-III количество накапливаемого вируса длительно, до 10-12суток не превышает 4 lg и лишь на короткий срок выходит на уровень около 5 lg ФОЕ/мл ($5,1 \pm 0,3$), не достигая уровня максимальных показателей размножения.

Основываясь на этих данных можно сделать вывод, что оптимальная МЗ, обеспечивающая стабильный урожай вируса на уровне $> 5,1 \text{ Ig ФОЕ/мл}$ в течение 6-7 суток при ежедневном сборе КЖ находится в диапазоне от 0,02 до 1.

Верхний предел размножения для вируса Пуумала составил $6,2 \text{ Ig ФОЕ/мл}$; Добрава/Белград и Сеул – $6,5 \text{ Ig ФОЕ/мл}$, вируса Хантаан – $7,2 \text{ Ig ФОЕ/мл}$. Можно предположить, что размножение хантавирусов ограничено скоростью репликации вируса. С другой стороны, принимая во внимание стратегию вируса на сохранение клетки, ограничение может зависеть от возможности клеток обеспечить соответствующую скорость синтеза компонентов сборки вируса (РНК, белков) и созревания (отпачковывания) вирионов на клеточных мембранах при сохранении жизнеспособности самой клетки. Вероятно, некое равновесие, достигаемое между этими процессами, стабилизирует хроническую инфекцию клеток хантавирусами. Об этом свидетельствуют результаты длительного, в течение 57 суток, наблюдения за размножением вируса Пуумала в культуре Vero E6: через 12 суток после заражения накопление вируса в среде снижалось и сохранялось до конца эксперимента в диапазоне $3,5 - 4,3 \text{ Ig ФОЕ/мл}$. Процент зараженных клеток ($98 \pm 2\%$), оставался неизменным на протяжении всего эксперимента и внешний вид культуры не отличался от контрольной. В общих чертах динамика вируса и антигена в хронически зараженной культуре повторяет динамику антигена в легких основного хозяина – рыжей полевки: в эксперименте у зараженных вирусом Пуумала полевков персистенция антигена регистрировалась на протяжении 14 месяцев (период наблюдения) (Апеккина и др., 2014).

2.3.2 Влияние различных условий на динамику накопления вируса Пуумала в КЖ

В серии опытов было показано, что накопление внеклеточного вируса не зависит от таких факторов, как: способ заражения – на монослой или во взвесь клеток; увеличение продолжительности контакта с вирусом свыше 1 часа при 37°C ; использования инокулята в виде культуральной жидкости или в виде клеточного лизата. Важным результатом при подборе оптимальных условий сбора вирусного урожая явилась возможность использования без сывороточных

сред в качестве среды поддержки. Было показано, что хантавирусы одинаково размножаются как в присутствии в среде поддержки 1-2 % сыворотки теленка или 0,25 % человеческого сывороточного альбумина, так и в отсутствии белковых компонентов среды. Обстоятельство не только удешевляющее производство вирусного вакцинного субстрата, но облегчающее последующие этапы очистки вируса от балластных белков.

Глава 3. Изоляция и идентификация хантавирусных штаммов

Изоляция хантавирусов в культуре клеток – это, по сути, адаптация их к размножению в другой биологической среде. Для хантавирусов обычно с этой целью используются клетки Vero E6. Нами была предпринята попытка изоляции хантавирусов в других культурах (ПТ-1, 4647) параллельно с культурой Vero E6. Материал для изоляции штаммов был отобран по результатам обследования на инфицированность хантавирусами более чем 800 мелких млекопитающих, отловленных на территории Большого Сочи (Адлерский, Лазаревский районы) с 2010 по 2013 гг., а также из двух районов Тамбовской области (Тамбовский и Никифоровский) в 2012 г. Всего было пропассировано в культуре Vero E6 - 65 биоматериалов, в культуре 4647 – 39, в культуре ПТ-1 – 40. В культурах 4647 и ПТ-1 пассажи биоматериала проводили параллельно с Vero E6. В результате удалось изолировать 3 штамма только в культуре Vero E6.

В результате иммунологической идентификации в реакции нейтрализации 2 штамма, выделенные от полевых мышей в Тамбовской области, были идентифицированы как генотип ДОБ/Куркино. Штамм, изолированный от кавказской лесной мыши, идентифицирован как генотип ДОБ/Сочи. Эффективность выделения вируса составила: от кавказской лесной мыши – 8,3 % (1 из 12); от полевой мыши – 10,5 % (2 из 19). На территории Тамбовской области это первое выделение вируса, циркуляция которого ранее была установлена по результатам иммунотипирования сывороток крови полевых мышей и больных ГЛПС (Мутных и др., 2011). Вновь изолированные штаммы не отличались иммунологически от ранее выделенных (более 10 лет назад) штаммов вирусов ДОБ/Куркино (Тульская, Липецкая области) и

ДЮБ/Сочи по форме и размеру инфекционных фокусов в культурах VERO и Vero E6. Это наблюдение, как и отличия фокусов, образуемых вирусами CFU (крупные), XTN (средние) и ПУУ (мелкие) в тех же культурах, позволяет предположить, что этот признак является одной из фенотипических характеристик хантавирусов. Похожие данные были получены McCaughey в искусственно созданных условиях закисления среды до pH 6,2. На 7 сутки инкубации в этих условиях наблюдалось ЦПД в виде синцития, при этом вид его, от очень больших очагов (вирус СЕУ) до средних (вирус XTN) и очень маленьких (вирус ПУУ) отражал таксономические различия хантавирусов (McCaughey et al., 1999).

Глава 4 Морфологическая характеристика хантавирусов

Изучение морфологических характеристик вируса Пуумала в культуре Vero E6 привело нас к неожиданным результатам. Вирионы, наблюдаемые при исследовании ультратонких срезов зараженной культуры, имели гетерогенную форму (округлые и эллипсоидные) и разброс в размерах от 90 до 300 нм. Морфология хантавирусов впервые была описана для вируса Хантаан в 1982 году при негативном контрастировании вирусных частиц из вирусосодержащей жидкости и лизата зараженных клеток, очищенных и сконцентрированных в градиенте плотности сахарозы (White et al., 1982, McCormick et al., 1982), а также для вируса Пуумала, очищенного из суспензии легких спонтанно инфицированных рыжих полевок (Donets et al., 1982). Три независимые группы авторов представили похожие описания вирионов, включая наличие шпикеров на внешней оболочке и размеры вирионов от 90 до 120 нм, ставшие таксономическими характеристиками рода Хантавирус. Позднее, методом крио-электронной микроскопии вируса Хантаан было подтверждено, что вирионы имеют сферическую форму, и средний диаметр их был определен в диапазоне от 120 до 154 нм (Battisti et al., 2011). Впервые нами обнаружены вирионы хантавируса Пуумала вытянутой эллипсоидной формы с максимальным размером около 300 нм. Похожие результаты были получены при электронной криотомографии вируса Тула, непатогенного хантавируса наиболее близкородственного вирусу Пуумала (Huiskonen et al., 2011). Было показано, что размер и форма вирионов вируса

Тула значительно варьировали, наблюдались сферические частицы размером 120-160 нм и продолговатые вытянутые частицы с диаметром 80 нм в поперечнике и максимальной длиной около 350 нм. Можно предположить, что наличие вирионов вытянутой формы, длина которых почти вдвое превышает ранее описанный средний диаметр хантавирусных вирионов, является уникальной особенностью, присущей, по крайней мере, двум близкородственным хантавирусам - Пуумала и Тула, адаптированным к размножению в культуре Vero E6. Морфологических отличий зараженной и не зараженной культуры клеток Vero E6 выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что культура VERO, сертифицированная для производства вакцин, поддерживает размножение вирусов Пуумала, Добрава/Белград, Хантаап и Сеул на уровне наиболее перmissive культуры Vero E6 и может использоваться в качестве субстрата при изготовлении вакцинных препаратов против геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).
2. Определены закономерности размножения вирусов-возбудителей ГЛПС в permissive клеточных культурах, оптимизированы условия получения вирусного субстрата для вакцинных препаратов. Показано, что использование без сывороточной среды и оптимальной множественности заражения клеток позволяет стабильно получать высокий урожай вируса, а также существенно облегчит дальнейшие этапы концентрирования и очистки полуфабрикатов вакцин.
3. Впервые показана возможность репликации штаммов вирусов Пуумала и Добрава/Белград в не свойственной им биологической системе – перевиваемых клетках, полученных из почки овцы и почки теленка, что открывает возможность дальнейшего изучения вопросов изменчивости хантавирусов, связанных с преодолением видового барьера.
4. В культуре Vero E6 от полевых мышей и кавказской лесной мыши изолированы штаммы вируса Добрава/Белград, идентифицированные как

генотипы ДОБ/Куркино и ДОБ/Сочи соответственно. Штаммы генотипов ДОБ/Куркино и ДОБ/Сочи имели различия по очертаниям и размеру фокусов при размножении в культурах Vero и Vero E6, как и штаммы вирусов Пуумала, Хантаан и Сеул, что позволяет рассматривать эти характеристики фокусов как отличительный фенотипический признак.

5. Впервые показано, что вирионы вируса Пуумала, адаптированного к размножению в культуре клеток, по форме и размерам значительно отличаются от аналогичных характеристик других патогенных хантавирусов, но имеют сходство с морфологией близкородственного непатогенного вируса Тула. Морфологических отличий зараженной и незараженной культуры клеток Vero E6 не выявлено.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также в зарубежном журнале, входящем в международные системы цитирования

1. Ткаченко Е.А. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в России – проблема XXI века / Е.А. Ткаченко, Т.К. Дзагурова, А.Д. Бернштейн, Н.М. Окулова, Н.А. Коротина, Д.В. Транквилевский, В.Г. Морозов, Ю.В. Юничева, Д.Л. Завора, М.В. Баловнева, С.Е. Соцкова, Е.С. Мутных, М.С. Смирнова, О.А. Леонович, А.Б. Шевелёв, Г.А. Малкин // Вестник Российской академии естественных наук. – 2012. – №1. – С. 48-54.
2. Дзагурова Т.К. Разработка иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом / Т.К. Дзагурова, О.Н. Солопова, П.Г. Свешников, Н.А. Коротина, М.В. Баловнева, О.А. Леонович, Н.Е. Варламов, Г.А. Малкин, С.Е. Соцкова, Е.А. Ткаченко // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 1. – С. 40-44.
3. Малкин Г.А. Особенности репликации хантавирусов – возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом в клеточных культурах различного происхождения / Г.А. Малкин, Т.К. Дзагурова, Н.А. Коротина,

- М.В. Баловнева, О.И. Конюшко, С.Е. Соцкова, Е.А.Ткаченко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – №. 4. – С 18-25.
4. Tkachenko E.A. Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia / E.A. Tkachenko, P.T. Witkowski, L.Radosa, T.K. Dzagurova, N.M. Okulova, Y. V. Yunicheva, V.G. Morozov, **G.A. Malkin**, D.H. Krüger, B. Klempa // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. – V. 29. – P. 156-163.
 5. Малкин Г.А. Морфологическая характеристика хантавирусов в культуре клеток Vero / Г.А. Малкин, Т.К. Дзагурова, Е.А. Ткаченко, И.А. Морозов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – №2. – URL: <http://www.science-education.ru/122-17381>
 6. Транквилевский Д.В. Вопросы организации мониторинга природных очагов инфекций опасных для человека. Планирование, проведение и анализ результатов полевых наблюдений / Д.В. Транквилевский, Д.А. Квасов, И.С. Мерсерякова, Т.В. Михайлова, М.И. Кормилицина, Т.Н. Демидова, Ю.В. Анапшина, О.В. Савельева, Г.А. Малкин, Е.С. Мутных, Н.А. Коротина, Т.К. Дзагурова, Н.И. Простаков, А.В. Сурков, С.А. Куролап, О.В. Клепиков, Ю.И. Стёпкин, М.И. Чубирко, В.И. Жуков // *Здоровье населения и среда обитания*. – 2014. – № 8. – С. 38 – 43.

Монография

Дзагурова Т.К. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Т.К. Дзагурова, **Г.А. Малкин** / *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство* / Москва: «Шико». – 2013. – С.377-393.

Благодарности

Глубокую благодарность выражаю: моему научному руководителю доктору медицинских наук Тамаре Казбековне Дзагуровой за помощь и постоянное внимание в период обучения в аспирантуре, за ценные советы на этапах планирования и выполнения работы; доктору медицинских наук, профессору Евгению Александровичу Ткаченко за внимание к работе и ценные рекомендации.

Благодарю всех сотрудников лаборатории Геморрагических лихорадок за поддержку и помощь в исследованиях, результатом которых явилась данная работа.

За предоставленные культуры клеток и ценные советы благодарю старшего научного сотрудника лаборатории Иммунологии и культур тканей кандидата биологических наук Ольгу Ивановну Кошошко.

За плодотворное сотрудничество искреннюю признательность и благодарность выражаю доктору медицинских наук, профессору Игорю Александровичу Морозову, а также сотрудникам его лаборатории

Благодарю рецензентов - доктора биологических наук Юсуфа Хаджибековича Хапчаева и кандидата биологических наук Татьяну Петровну Ермесову за ценные замечания на стадии редактирования рукописи.

Благодарю директора ФГБНУ ИПВЭ им.М.П.Чумакова член-корреспондента РАН, профессора Михаила Ивановича Михайлова за предоставленную возможность выполнить диссертационную работу.

Глубокую признательность выражаю кандидату биологических наук Лидии Юрьевне Романовой за оказанную помощь и поддержку.

4

Подписано в печать: 17.04.2015

Заказ № 10718 Тираж - 100 экз.
Печать трафаретная. Объем: 1,5 усл.п.л.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru