

УДК 619;616-078: 578

UDC 619;616-078: 578

**КОНТРОЛЬ ПЕРСИСТЕНЦИИ ВИРУСА
БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК
VERO С ПОМОЩЬЮ ПРЯМОГО МЕТОДА
ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ**

**CONTROL OF AKABANE VIRUS
PERSISTENCE IN A VERO CELL CULTURE
USING THE DIRECT
IMMUNOFLUORESCENCE METHOD**

Котова Ольга Юрьевна

Kotova Olga Yurievna

Хан Евгения Олеговна

Khan Evgeniya Olegovna

Кушнир Светлана Дмитриевна
к.в.н.

Kushnir Svetlana Dmitrievna
Cand.Vet.Sci.

Пономарев Виктор Николаевич
д.б.н.

Ponomarev Viktor Nikolaevich
Dr.Sci.Biol., professor

Юрков Сергей Григорьевич
д.б.н., профессор

Yurkov Sergey Grigorievich
Dr.Sci.Biol.

Балашова Елена Алексеевна
к.б.н.

Balashova Elena Alekseevna
Cand.Biol.Sci.

e-mail: balashowa.l@yandex.ru

e-mail: balashowa.l@yandex.ru

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии, г. Покров, Россия*

*SRI National Research Institute for Veterinary
Virology and Microbiology of Russia, Pokrov, Russia*

Статья посвящена идентификации возбудителя болезни Акабане в новой, ранее не использовавшейся в России для этих целей, перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO). При этом отмечено, что срок выявления вируса с использованием метода флуоресцирующих антител значительно сокращается

The article covers the Akabane disease agent identification in the new green monkey kidney continuous cell line (VERO) that has not been used for that in Russia before. Besides, the time for the virus detection using the fluorescent antibody method was found to be considerable decreased

Ключевые слова: ВИРУС БОЛЕЗНИ АКАБАНЕ,
МЕТОД ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ,
КУЛЬТУРА КЛЕТОК VERO

Keywords: AKABANE DISEASE VIRUS,
FLUORESCENT ANTIBODY METHOD, VERO
CELL CULTURE

Введение

Болезнь Акабане - зоонозная, арбовирусная болезнь крупного рогатого скота, овец и коз, характеризующаяся абортами, нарушениями эмбрионального развития плода, преждевременными родами и рождением мертвых или уродливых плодов (синдром врожденного артрогрипоза-гидроэнцефалита), наносящая значительный экономический ущерб странам, где она имеет или имела место распространения (Япония, Корея, Тайвань, Австралия, Турция, Израиль, Сирия, Кипр, Африка).

В связи с закупкой фермерами Российской Федерации скота из стран дальнего зарубежья, а также многообразием и разносторонностью политических, культурных, туристических связей с ближним и дальним зарубежьем, не исключен занос на территорию РФ возбудителей экзотических инфекций, в том числе болезни Акабане. Наличие этой болезни в Турции создает потенциальную угрозу заноса возбудителя в Грузию и далее на территорию нашей страны.

Вирус болезни Акабане передается через клещей и комаров, что обеспечивает создание стойких природных очагов в суровых климатических условиях и создает возможность расширения круга позвоночных хозяев. Длительное сохранение вирусной популяции среди восприимчивых позвоночных способствует быстрому распространению среди диких и домашних животных в благоприятный для кровососущих насекомых климатический период.

В отношении возможной патогенности вируса для человека имеется единичное сообщение в Международном каталоге арбовирусов (1975 г.)

Вирус болезни Акабане относится к роду *Orthobunyavirus* семейства *Bunyaviridae*, серологической группы Симбу, в которую входят вирусы болезней Шмалленберг (первая вспышка болезни в Западной Европе в 2011 г.), Айно, Шамонда. Геномы последних имеют сходство с геномом вируса болезни Акабане (вирус впервые был изолирован от комаров *Culex tritaeniorhynchus* в 1959 году в Японии в эпизоотическом очаге) [1].

Поэтому при постановке диагноза необходимо дифференцировать болезнь Акабане от выше перечисленных болезней и от других клинически сходных заболеваний: болезни Найроби, лихорадки долины Рифт, болезни Ибараки, блютанга.

Для первичного выделения вируса болезни Акабане из патологического материала используют одно-двухдневных белых мышей-сосунков, которые представляют собой наиболее чувствительную систему

для изоляции всех буньявирусов. Для выделения вируса отбирают пробы патологического материала от плодов абортировавших животных: мозга, лимфоузлов, селезенки, почек, скелетных мышц, плаценты, крови.

Из проб органов готовят 10 % суспензии на физиологическом растворе с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин В), выдерживают 30 минут при 37°C, центрифугируют, затем используют надосадок для интрацеребрального заражения мышей-сосунков.

Суспензию мозга больных и павших мышей-сосунков используют для заражения чувствительных к вирусу болезни Акабане первичных и перевиваемых культур клеток животных. Идентификацию вируса болезни Акабане проводят методом иммунофлуоресценции [2].

Вирус болезни Акабане может персистировать как в организме животных, так *in vitro* в культуре клеток почки африканской зеленой мартышки (CV-1), почки сибирского горного козерога (ПСГК), почки эмбриона африканской козы (ПЭАК) [3]. В культуре клеток CV-1 вирус Акабане вызывает цитопатические изменения, выражающиеся в округлении клеток с последующим цитолизом и отслоением клеточного монослоя через 48 часов после заражения [4].

Цель исследований

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO) для быстрого обнаружения антигена вируса болезни Акабане методом иммунофлуоресценции.

Материалы и методы

В работе использовали вирус болезни Акабане, шт. 8935 и общепринятый в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии метод заражения культур клеток вирусами болезней животных.

Для идентификации антигена вируса использовали прямой метод флуоресцирующих антител, который быстро выполняем, чувствителен,

специфичен и является доступным методом лабораторной диагностики при выявлении антигенов вирусов в культурах клеток и поэтому широко используется в ветеринарной практике. Методом флюоресцирующих антител специфический антиген может быть обнаружен в образцах клеточных культур, инфицированных исследуемым материалом. Схема реакции иммунофлюоресценции имеет одну динамическую фазу – фазу специфического узнавания антигена антителом. В основе метода лежит иммунологическая реакция между специфическим антигеном и антителами к нему, мечеными флюорохромами.

Окраску клеток VERO, инфицированных вирусом болезни Акабане, проводили специфическим к данному вирусу ФИТЦ-конъюгатом из «Набора препаратов для иммунофлуоресцентной диагностики болезни Акабане» производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии г. Покров.

ФИТЦ-конъюгаты получали из иммуноглобулинов G, выделенных из иммуноасцитической жидкости (ИАЖ) мышей с помощью афинной хроматографии на Протеин-А-Сефарозе. Данный метод очистки иммуноглобулинов гарантировал достаточно высокую специфичность МФА, степень очистки и устойчивость к химическим и физическим воздействиям в процессе конъюгирования. В качестве флюорохрома мы использовали флюоресцеинизотиоционат.

Одно-двухдневных мышей-сосунков заражали интрацеребрально вирусом болезни Акабане (10%-ная суспензия мозга мышей), полученным из лаборатории Музейных штаммов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров. Клинические признаки, характерные для вирусов семейства *Bunyaviridae* (потерю рефлекса сосания, параличи и гибель) наблюдали с первого пассажа.

Павших через сутки мышей-сосунков уничтожали, т.к. это может быть не специфический падеж, а реакция на введенный материал. От больных и павших через двое суток после заражения вирусом болезни

Акабане мышей-сосунков отбирали мозг, который замораживали при температуре минус 60⁰С, затем размораживали.

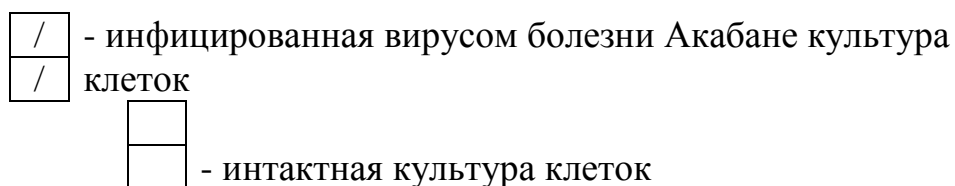
Из мозга больных и павших мышей-сосунков готовили 10%-ную суспензию и десятикратным разведением (10⁻¹) данного материала заражали перевиваемую линию клеток почки африканской зеленой мартышки .

Культуру клеток VERO выращивали в среде Игла-МЕМ с 10% сыворотки крови плода КРС в 96-луночных полистироловых панелях производства «Costar» и отечественного производства.

После суток инкубации состояние культуры клеток оценивали под световым инвертированным микроскопом и при формировании сплошного монослоя в лунки панелей вносили, предварительно удалив ростовую среду, по 100 мкл десятикратного разведения (10⁻¹) на среде Игла МЕМ 10 %-ной суспензией мозга мышей-сосунов, содержащей вирус болезни Акабане, шт. В 9835 (7,2 Ig МЛД 50/мл) и среду Игла МЕМ. В ряд лунок с культурой клеток VERO вносили вирусосодержащий материал, в ряд - среду Игла МЕМ, так 6 повторов (рис.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	/		/		/		/		/		/	
2	/		/		/		/		/		/	
3	/		/		/		/		/		/	
4	/		/		/		/		/		/	
5	/		/		/		/		/		/	
6	/		/		/		/		/		/	
7	/		/		/		/		/		/	
8	/		/		/		/		/		/	

Рис.1 Схема посева клеток VERO в 96-луночной панели:



На время контакта (1,5 - 2 часа) мозговой суспензии с культурой клеток VERO панели помещали в CO₂ инкубатор с повышенным до 5% содержанием углекислого газа и 90% относительной влажности. После контакта инокулированную жидкость удаляли стряхиванием, монослой клеток в панелях промывали 1-2 раза средой Игла MEM с добавлением антибиотиков и опять удаляли стряхиванием.

В каждую лунку вносили 150 мкл поддерживающей среды Игла MEM и помещали панели в CO₂ инкубатор.

Через каждые сутки, начиная с первых, отбирали по одной панели, стряхиванием удаляли поддерживающую среду, высушивали монослой культуры клеток VERO, фиксировали 20 % раствором охлажденного ацетона и опять высушивали. Эту процедуру повторяли в течение трех суток. Высушенные панели до обработки ФИТЦ-конъюгатом хранили при температуре минус 60⁰С.

После разморозки панели подсушивали при комнатной температуре в течение 30-40 минут, затем в лунки вносили по 50 мкл ФИТЦ-конъюгата в рабочем разведении, охватывая лунки с зараженной и интактной культурой клеток, инкубировали при температуре 37⁰С в течение 30 минут. Затем конъюгат удаляли, клетки промывали физиологическим раствором (рН 7,2 – 7,4) путем внесения и удаления его из лунок 4-5 раз.

Результаты исследований

Результаты идентификации вируса болезни Акабане в культуре клеток VERO фиксировали после наблюдения препаратов под инвертированным люминесцентным микроскопом.

Через 24 часа после инокуляции вируса болезни Акабане в культуру клеток VERO и после обработки инфицированных клеток ФИТЦ-конъюгатом наблюдали одиночные флюоресцирующие клетки (фото 1).

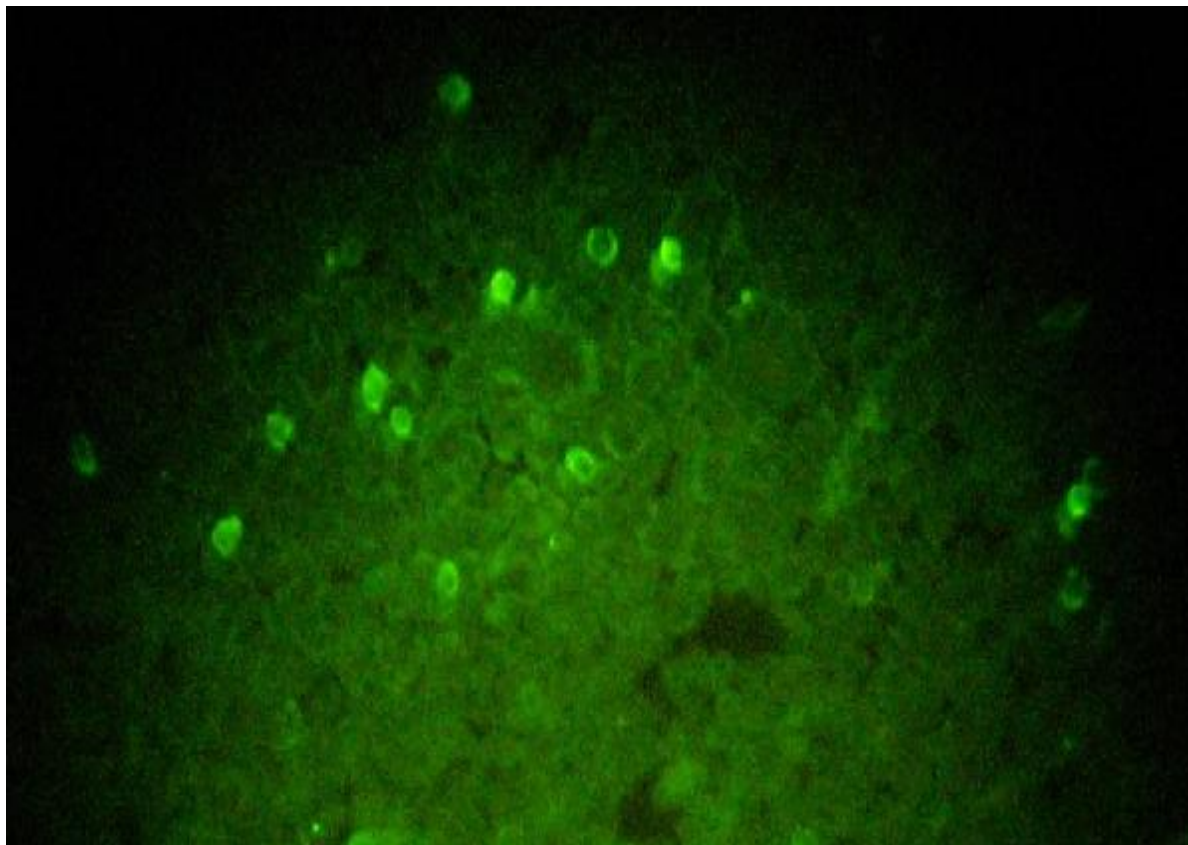


Фото 1. Культура клеток VERO через 24 часа после инфицирования вирусом болезни Акабане

Через 48 часов после инокуляции вируса болезни Акабане в культуру клеток VERO и после обработки инфицированных клеток ФИТЦ-конъюгатом наблюдали группы флюоресцирующих клеток (фото 2).

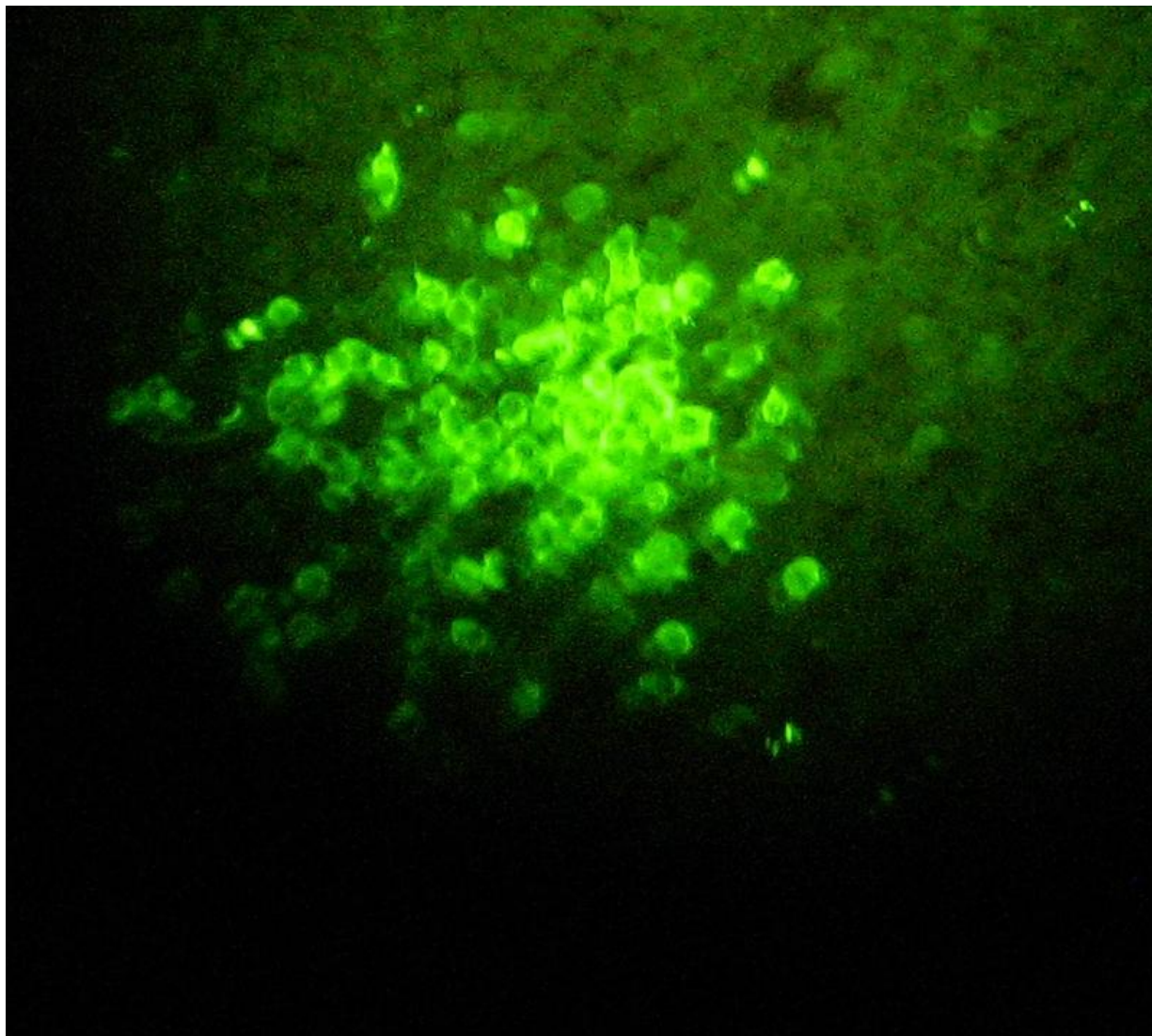


Фото 2. Культура клеток VERO, через 48 часов после инфицирования вирусом болезни Акабане

В интактной культуре флуоресценции не наблюдали (фото 3).

Отсутствие свечения в интактной (контрольной) культуре клеток VERO при обработке ее ФИТЦ-конъюгатом против болезни Акабане позволило нам судить о специфичности свечения в инфицированной культуре клеток VERO.



Фото 3. Интактная культура клеток VERO

Необходимо отметить, что в течение 48 часов вирус болезни Акабана размножался в культуре клеток VERO без проявления цитопатических действий. Только через 60-72 часа культивирования наблюдали деструктивные изменения клеточного монослоя.

Выводы

После проведенных исследований мы сделали следующие выводы.

1. Культура клеток VERO чувствительна к вирусу болезни Акабане и пригодна для выявления антигена вируса болезни Акабане.

2. Прямым методом иммунофлуоресценции можно идентифицировать антиген вируса болезни Акабане в зараженной культуре клеток VERO на двое суток (48-60 часов) раньше, по сравнению с выявлением его по цитопатическому эффекту, что важно, т.к. раннее обнаружение вируса является залогом своевременного и эффективного развертывания системы профилактических мероприятий.

Список литературы

1. Isolation of arbor viruses from mosquitoes collected at live-stock pens in Gumma Prefecture in 1959 / Matumoto M., Oya A., Ogata T., Kobayashi I., Nakamura T., Takahashi H., Kitaoka M. // Jap. J. Med. Sci. Biol. –1960. –V.13. -P.191-198.

2. Диагностика болезни Акабане методом флюоресцирующих антител / И.Ф. Вишняков, Е.А. Балашова // Информационный бюллетень 1994. ИЭКВМ. –Харьков, 1995. -С.52.

3. Чувствительность перевиваемых линий культур клеток к вирусу болезни Акабане / Е.А. Балашова, И.Ф. Вишняков, Г.Н. Чурбанова, С.А. Витина. // Материалы научной конференции ВНИИВВиМ 13-18 апреля 1992 г. –Покров, 1992. -Ч.1. -С.142.

4. Изучение цитопатического эффекта, вызываемого вирусом Акабане, в перевиваемой культуре клеток CV-1 / Н.В. Черных, Е.А. Балашова, И.Ф. Вишняков, С.А. Витина, С.Ф. Чевелев // Материалы научной конференции ВНИИВВиМ 13-18 апреля 1992 г. –Покров, 1992. -Ч.1. -С.140-141.