

БЫСТРЫЙ КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ МЕТОД ДЛЯ ИНДИКАЦИИ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

И.П. Баркова, Ф.Г. Нагиева, В.Г. Никулина, А.Н. Лисаков

ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

Резюме. Для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах был усовершенствован быстрый культуральный метод, позволяющий в течение 5 часов с момента инфицирования чувствительной клеточной культуры обнаружить антигены вируса бешенства. С этой целью мы использовали вариант клеточной культуры ВНК-Е, чувствительный к вирусу бешенства, поликлональные антирабические иммуноглобулины, меченые ФИТЦ и прямой метод мембранной иммунофлюоресценции. Данный метод с использованием в качестве фиксатора инфицированных клеток двукратного свежешелушенного 3% параформальдегида позволял выявлять ранние вирусные белки вируса бешенства.

Ключевые слова: вирус бешенства, инфицированные клетки, быстрый клеточный метод, параформальдегид.

Введение

Бешенство представляет собой острое неврологическое заболевание центральной нервной системы, вызываемое вирусом бешенства, представителем рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Вирус бешенства состоит из однонитевой геномной РНК и 5 структурных белков: нуклеопротеина (N), фосфопротеина, связанного с нуклеокапсидом (P), матриксного белка (M), гликопротеина (G) и полимеразы (L) [8, 12, 14].

Передача вируса бешенства происходит, главным образом, путем контакта со слюной бешеного животного. Основными группами риска среди животных, которые передают бешенство, являются собаки, кошки, лисы, летучие мыши, еноты, скунсы, койоты, обезьяны и волки [6].

Обычно бешенство вызывает смертельное заболевание, характеризующееся тяжелой энцефалопатией и генерализованным парезом, как у людей, так и у животных [9].

По данным ВОЗ ежегодно в мире от бешенства умирает от 40 000 до 70 000 человек. Оно регистрируется на территории более 167 стран мира, где свыше 10 млн человек получают различные повреждения от животных и более 4 млн человек — специфическую антирабическую помощь [13].

Ситуация по бешенству в Российской Федерации также остается достаточно напряженной, отмечается рост неблагополучных пунктов, чему способствует интенсивная циркуляция вируса бешенства в дикой природе, высокая миграция животных, ежегодно отмечающееся вовлечение в эпизоотический процесс новых видов диких животных [2].

Основным резервуаром инфекции в дикой природе в настоящее время продолжает оставаться лисица, увеличивается удельный вес волков и енотовидной собаки. Для человека важнейшим резервуаром вируса бешенства являются собаки. В связи с тем, что бешенство

Авторы:

Баркова И.П., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;

Нагиева Ф.Г., д.м.н., зав. лабораторией гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;

Никулина В.Г., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;

Лисаков А.Н., младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия.

Адрес для переписки:

Нагиева Фиряя Галиевна
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15, отдел вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН.
Тел.: (495) 674-76-45 (служебн.); 8 916 272-79-01 (моб.). E-mail: firaya77@gmail.com

поступила в редакцию 10.08.2013
отправлена на доработку 11.09.2013
принята к печати 21.10.2013

© Баркова И.П. и соавт., 2013

является летальной инфекцией и имеет важное социальное значение, необходима точная и своевременная диагностика этой болезни, особенно в случае опасности передачи бешенства человеку, при этом очень важна прижизненная диагностика бешенства. Поставить прижизненный диагноз бешенства позволяет иммунофлюоресцентное окрашивание биоптатов кожи, мазков — отпечатков роговицы и мазков слюны [3, 5].

Дизайн методов, применяемых в лабораторной диагностике бешенства, и выбор подходящего метода быстрой диагностики основывается на знании репликации и антигенной структуры вируса бешенства [7].

Для изоляции вируса бешенства был разработан культуральный тест, успешно заменивший тест заражения мышей в мозг. Авторами был создан культуральный тест с использованием клеток ВНК-21 в специальной камере для культивирования клеток с получением конечного результата за 48 часов [10].

Цель нашей работы состоит в усовершенствовании лабораторной диагностики рабической инфекции с использованием чувствительных клеточных культур и поликлональных флюоресцирующих антирабических иммуноглобулинов.

Материалы и методы

Культура клеток и питательные среды. Клеточная линия ВНК-21-F получена из коллекции ФГУ «ВГНКИ». Клеточные линии Vero, MDBK и MDCK поддерживались в нашей лаборатории. Клеточные линии Vero и MDBK культивировали в среде ДМЕМ с 2 мМ глутамина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицином 40 мкг/мл, а клеточную линию ВНК-21-F в среде RPMI-1640 с вышеуказанными добавками.

Вирусы. Пастеровский лабораторный штамм «СВС», изолированный от собаки, получен из ФГУ «ВГНКИ». Вакцинный штамм «НИ-ИЗЖ» получен из ВНИИЗЖ (г. Владимир).

Быстрый культуральный метод (БКМ) в нашей модификации [1]. Клеточную культуру ВНК-21-F в концентрации 70×10^3 клеток на лунку засеивали в ростовой среде RPMI-1640 с 5% ЭТС и 40 мкг/мл гентамицина в объеме 1 мл на 24-луночные планшеты. Через 24–48 ч культивирования после формирования сплошного слоя клеток, монослой дважды промывали фосфатным буфером и в лунки вносили по 0,5 мл десятикратных разведений вируса бешенства в поддерживающей среде RPMI-1640 с 1% ЭТС и культивировали при 34°C. На каждое разведение вируса использовали по 3 лунки. Исходный титр вируса составлял $lg 8,0 IF_{50/0,5 \text{ мл}}$. С 0 до 24 ч культивирования проводили детекцию вирусинфицированных клеток с помощью поликлональных антира-

бических флюоресцирующих иммуноглобулинов в прямой реакции мембранной иммунофлюоресценции (МИФ).

Для этой цели планшеты с инфицированными клеточными культурами замораживали—оттаивали, содержимое лунок переносили в центрифужные пробирки и клетки осаждали при 1500 об/мин в течение 5 мин. По окончании центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, а из осадка готовили мазки. Для этого по 5 мкл клеточного осадка распределяли на предметных обезжиренных стеклах, высушивали при комнатной температуре, фиксировали дважды свежешелуфированным 3% параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре, затем промывали водопроводной водой, подсушивали при комнатной температуре и окрашивали антирабическим ФИТЦ-конъюгатом. Окрашивание проводили во влажной камере при 36,5°C в течение 40 мин. Реакцию учитывали на флюоресцентном микроскопе «Optica» под иммерсией при $\times 1000$ увеличении. Контролем служили неинфицированные клетки. В препаратах учитывали флюоресцирующие фокусы в различные временные интервалы.

Результаты и обсуждение

Из литературы известно, что более 41 клеточной линии, включая первичные культуры клеток, штаммы диплоидных клеток, гетероплоидные клеточные линии и лейкоциты различного видового происхождения, чувствительны к рабической инфекции [5, 11]. Из перевиваемых клеточных линий высокочувствительными к вирусу бешенства (ВБ) считаются клетки почки сирийского хомячка ВНК-21, клон 13. В предварительных исследованиях нами была изучена чувствительность к вирусу бешенства 4-х клеточных линий (ВНК-21-F, Vero, MDBK и MDCK) на различных пассажных уровнях. Детекцию вируса в инфицированных клеточных культурах оценивали в реакции прямой иммунофлюоресценции с иммунной сывороткой собаки, конъюгированной с ФИТЦ.

Учитывая, что кинетика размножения вируса бешенства в культуре клеток характеризуется одновременным накоплением как внутреннего, так и экстрацеллюлярного вируса, после сбора вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с инфицированной клеточной поверхности мы разрушали клеточный монослой 3-кратным замораживанием при -70°C и оттаиванием инфицированных клеток, и обе фракции вирусного сбора объединяли. Титры вируса определяли на клетках, выращенных в 24-луночных планшетах (Costar, США) путем титрования ВСЖ методом предельных разведений на тех клеточных культурах, на которых проводили пассирование вируса. После завершения культиви-

ТАБЛИЦА 1. ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР К РАЗЛИЧНЫМ ШТАММАМ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ПРЯМОЙ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Штаммы вируса бешенства	Титр вируса в Ig IF _{50/0,5 мл} в клеточных культурах на различных пассажных уровнях (в скобках уровень пассажа)			
	ВНК-F (8–13)	МДВК (4–10)	МДСК (5–8)	Vero (5–8)
CVS	6,5–8, 0	5,0–8,0	6,0–6,5	5,0–5,5
ВНИИЗЖ	7,5–8,0	5,5–7,0	6,0–6,5	5,0–5,5

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «CVS» ПРИ БЫСТРОМ КУЛЬТУРАЛЬНОМ МЕТОДЕ

Время инкубации (в часах)	Доза вируса в IF _{50/0,5 мл}				
	1 (10 ⁻⁸)*	10 (10 ⁻⁷)	100 (10 ⁻⁶)	1000 (10 ⁻⁵)	10000 (10 ⁻⁴)
3	–	–	–	–	–
5	–	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
Контроль клеток	–	–	–	–	–

Примечание: * в скобках указано разведения вируса; «–» — отсутствие антигена, «+» — наличие антигена.

вания при 34°C в течение 6–7 сут из клеточной взвеси каждого разведения готовили препараты на предметных стеклах и оценивали инфицированность клеток в реакции прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) с использованием поликлональных овечьих антирабических иммуноглобулинов, меченных ФИТЦ (коммерческий препарат получен из биокомбината г. Щелково).

В табл. 1 приведены результаты титрования. Результаты титрования показали, что наиболее чувствительными оказались клеточные линии ВНК-F и МДВК. Учитывая, что более воспроизводимые результаты титрования ВСЖ были получены на клеточной линии ВНК-F, дальнейшие наши исследования проводили на этой клеточной линии.

В табл. 2 представлены результаты выявления антигенов вируса бешенства в клеточной культуре ВНК-F, инфицированной различны-

ми дозами вируса, начиная с одной дозы и завершая 10 000 в МИФ.

Как видим, из данных представленных в табл. 2, через 3 ч после инфицирования клеток ВНК-F ни с одной из зараженных доз вируса не было выявлено антигена ВБ. Через 5 ч с момента инфицирования при заражающей дозе вируса равной 10 дозам и больше в инфицированных клетках выявляли антиген ВБ. К 24 ч с момента инфицирования наблюдали степень увеличения антирабического антигена в клетках при всех заражающих дозах, при этом цитопатическое действие вируса на клеточных культурах еще не проявлялось.

Таким образом, быстрый культуральный метод с использованием МИФ позволяет в течение 5 часов с момента инфицирования чувствительных клеток ВНК-21-F установить этиологический диагноз бешенства с высокой специфичностью.

Список литературы

- Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Никулина В.Г., Юминова Н.В., Антонова Т.П., Федотов А.Ю. Экспресс-диагностика краснушной инфекции методом прямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител к белку Е1 вируса краснухи // Инфекция и иммунитет. — 2012. — Т 2, № 4. — С. 735–740.
- Равилов А.З., Хисматулина Н.А., Юсупов Р.Х. Комплексное изучение бешенства животных и меры борьбы с ним // Ветеринария. — 2000. — № 6. — С. 7–10.
- Фоменко М.В., Тутов И.К. Порядок и оценка результатов лабораторных исследований при диагностике бешенства // Вестн. ветеринарии. — 1997. — № 4. — С. 47–50.

Ссылки 4–14 см. в References (с. 326). See References for numbers 4–14 at p. 326.

THE RAPID CULTURE METHOD FOR THE INDICATION OF RABIES VIRUS ANTIGEN IN INFECTED CELL CULTURES

Barkova E.P., Nagieva F.G., Nikulina V.G., Lisakov A.N.

Mechnicov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS, Moscow, Russian Federation

Abstract. The rapid culture method for the indication of antigens of rabies virus has been improved. It allows to detect the antigen of rabies virus within 5 hours from the moment the cell cultures was infected. To achieve this aim it is necessary to use cell culture BHK-F, polyclonal antirabies FITC labelled immunoglobulin and direct method of membrane immunofluorescence. Applying of twofold freshly filtrated 3% paraformaldehyde as fixing solution allows to detect early virus proteins of rabies virus.

Key words: rabies virus, infect cell, rapid cell culture method, paraformaldehyde.

Authors:

Barkova E.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnicov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS, Moscow, Russian Federation;

Nagieva F.G., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnicov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS.

115088, Russian Federation, Moscow, 1st Dubrovskaya str., 15.

Phone: (495) 674-76-45 (office); +7 916 272-79-01 (mobile). E-mail: firaya77@gmail.com;

Nikulina V.G., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnicov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS, Moscow, Russian Federation;

Lisakov A.N., Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnicov Research Institute of Vaccines and Sera, RAMS, Moscow, Russian Federation.

References

1. Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., Nikulina V.G., Yuminova N.V., Antonova T.P., Fedotov A.Yu. Ekspres-diagnostika krasnushnoy infektsii metodom pryamoy immunoflyuorestsentsii s ispol'zovaniem monoklonaľnykh antitel k belku E1 virusa krasnukhi [Express-diagnostic of rubella infection by the immunofluorescent assay using monoclonal antibodies to protein E1 of rubella virus]. *Infektsiya i immunitet — Infection and Immunity*, 2012, vol. 2, no. 4, pp. 735–740.
2. Ravilov A.Z., Hismatulina N.A., Yusupov R.H. Kompleksnoe izuchenie beshenstva zhivotnykh i mery bor'by s nim [Complex study of rabies infection in animals and combating measures]. *Veterinariya — Veterinary Science*, 2000, no. 6, pp. 7–10.
3. Fomenko M.V., Tutov I.K. Poryadok i otsenka rezul'tatov laboratornykh issledovaniy pri diagnostike beshenstva [Order and estimate of results of the laboratory research on rabies diagnostics]. *Vestnik veterinarii — Veterinary Science Reporter*, 1997, no. 4, pp. 47–50.
4. Bordighon J., Piza A.T., Alvares-Silva M., Caporale G.M., Carrieri M.L., Kotait I., Zanetti C.R. Isolation and replication of rabies virus in C6 Rat glioma cells (clone CCL-107). *Biologicals*, 2001, vol. 29, no. 2, pp. 67–73.
5. Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P. The fluorescent antibody test. *Laboratory techniques in rabies*; eds. F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. — Geneva, 1996, pp. 88–93.
6. Hendekli C.M. Current therapies in rabies. *Arch. Virol.*, 2005, vol. 150, pp. 1047–1057.
7. Knobel D.L., Cleaveland S., Coleman P.G., Fevre E.M. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull. World Health Organ.*, 2005, vol. 83, pp. 1–11.
8. Nishizono A., Khawplod P., Ahmed K., Goto K., Shiota S., Mifune K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Mannen K., Tepsumethanon V., Mitmoonpitak C., Inoue S., Morimoto K. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiol. Immunol.*, 2008, vol. 52, iss. 4, pp. 243–249.
9. Rupprecht C.E., Halon C.A., Hemachudha T. Rabies reexamined. *Lancet Infect. Dis.*, 2002, vol. 2, pp. 327–343.
10. Rudd R.S., Trimarchi C.V., Abelseth M.K. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1980, vol. 12, no. 4, pp. 590–593.
11. Webster W.A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*, 1987, vol. 51, no. 3, pp. 367–369.
12. Winner W.H., Larson J.K., Dietzschold B., Smith C.L. The molecular biology of rabies viruses. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, vol. 10, suppl. 4, pp. 771–784.
13. WHO Expert consultation on rabies: first report. *WHO technical report series 931*, 2005, Geneva, Switzerland.
14. Wunner W.H. Rabies virus. In: Rabies; eds. A.C. Jackson, H. Wunner. *New York: Academic Press*, 2002, pp. 23–77.