

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВИРУСА ЭБОЛА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

Рустамова Л.М., Красько А.Г., Родионова Л.П., Семенов С.Ф.,

Богданова Н.Л., Семижон П.А., Владыко А.С.,

*Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Описаны методы восстановления вируса Эбола после длительного хранения. Подтверждена его аутентичность в реакции непрямой иммунофлуоресценции и методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами на матрицах РНК, выделенных из культуральной жидкости, содержащей вирус Эбола.

Введение. В последние годы происходят существенные изменения эпидемических проявлений геморрагических лихорадок Ласса, Эбола, Марбург. Очевидна глобализация эпидемического процесса — масштабность, рост заболеваемости, сокращение интервалов между эпидемическими вспышками, нарастание опасности распространения инфекции из очага на неэндемичные территории. Особую актуальность приобретает необходимость обеспечения биологической безопасности страны, которая обусловлена сохраняющейся угрозой распространения опасных и особо опасных инфекций, что связано с неблагоприятной эпидемической ситуацией в мире. Разработки ученых разных стран мира направлены на осуществление мониторинга таких инфекций, создание препаратов для диагностики, а также лечения и профилактики [1, 2].

Особо важными являются исследования по поддержанию и сохранению штаммов вирусов, используемых для изготовления диагностических препаратов. Такие штаммы хранятся десятилетиями в неизменном состоянии, детально изучаются и создаются условия их сохранения с фиксацией первоначальных свойств [3]. Коллекционный фонд Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека — объекта национального достояния — содержит штаммы вирусов особо опасных инфекций, в т. ч. вирус Эбола, которые были заложены на хранение в 90-х гг. прошлого столетия. Задачей первостепенной важности в настоящее время является восстановление хранящихся штаммов и исследование аутентичности и сохранение биологических свойств [4, 5].

Ключевые слова: особо опасные вирусные инфекции, филловирусы, вирус Эбола, хранение, восстановление.

Цель работы — восстановление вируса Эбола, штамм Заир, находящегося на хранении в фонде Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека. Вирус Эбола относится к патогенным биологическим агентам (ПБА) I группы. Все исследования проведены в соответствии с требованиями санитарных норм и правил безопасной работы, оговоренных в Санитарных правилах СП 1.2.011-94 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». Работы выполнены в специальных защитных технологических линиях с отрицательным давлением внутри и каскадом фильтров тонкой очистки воздуха. Условия соответствуют международному уровню биобезопасности BSL4 (рисунок 1).



Рисунок 1. — Защитная технологическая линия для работы с патогенными биологическими агентами I группы

Материалы и методы. В работе использовали вирус Эбола, штамм Заир, полученный из Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

Восстановление вируса Эбола осуществляли пассажем в перевиваемой линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero E6 в соответствии с инструкцией «Методы диагностики особо опасных инфекций с использованием технологии культивирования вирусов I–II групп патогенности» № 011-1014 (утв. 18.12.2014). Вирусный пассажный материал собирали на 2–8-е сут, дважды замораживали при минус 20°C, оттаивали при ком-

натной температуре, определяли инфекционную активность на культуре клеток Vero E6 под агарозным покрытием. Титр вируса определяли путем подсчета негативных колоний и расчета по методу Рида и Менча в lg БОЕ/мл. Полученную вирусную суспензию штамма закладывали для хранения в фонд коллекции в виде культуральной жидкости при -70°C. Подтверждение аутентичности восстановленного после хранения штамма оценивали с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции (ИРИФ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для идентификации вируса Эбола была использована универсальная пара олигонуклеотидов (праймеров), ограничивающая фрагмент L-сегмента вирусного генома размером 419 бп.

M/E/L f	13213–13234	5'-ATCGGAATTTTTCTTTCTCATT-3'	419 н.п.L- сегмент Эбола
M/E/L r	13631–13601	5'-ATGTGGTGGGTATAATAATCACTGACATG-3'	

Для выделения РНК использовали:

- набор реагентов QIAamp MinElute Virus Spin Kit фирмы Qiagen, США;
- набор «РИБО-преп» фирмы «АмплиСенс», РФ;
- набор «Комплект для выделения ДНК/РНК», фирмы «Литех», РФ;
- РНК-золь — гуанидин-фенол содержащий раствор, аналог Trizol, Life technologies, разработанный в лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики РНПЦ эпидемиологии и биотехнологии. Постановку реакции обратной транскрипции проводили со случайными праймерами с использованием набора «Реверта-L», производство ФГУН ЦНИИ эпидемиологии (РФ). Электрофоретический анализ фрагментов ДНК (амплификация диагностически значимых фрагментов) проводили в 1–1,5% агарозных гелях. В качестве электродного буфера использовали 1xTAE. Для визуализации анализируемой ДНК гели окрашивали раствором бромистого этидия в конечной концентрации 1,0 мкг/мл.

Результаты и их обсуждение. Основная особенность методологии культивирования патогенных вирусов — сохранение исходных биологических свойств микроорганизмов путем проведения минимального количества обогатительных и восстановительных пассажей с использованием биологических систем, минимально воздействующих на гено- и фенотип конкретных штаммов микроорганизмов. Исследования с коллекционными культурами микроорганизмов должны гарантировать адекватность свойств музейных штаммов характеристикам их природных прототипов. Основной характеристикой пригодности системы для поддержания возбудителя является стабильность маркерных показателей вируса при последовательных пассажах в этой системе.

Развитие инфекционного процесса при филовиральных инфекциях зависит от чувствительности переливаемых культур клеток и множественности инфицирования. Начальным этапом исследований явилось проведение восстановительных пассажей вируса Эбола и определение культуральных показателей, характеризующих репродуктивные свойства вирусной популяции. Максимальные величины титра вируса Эбола выявлены на 7-е сут (рисунок 2).

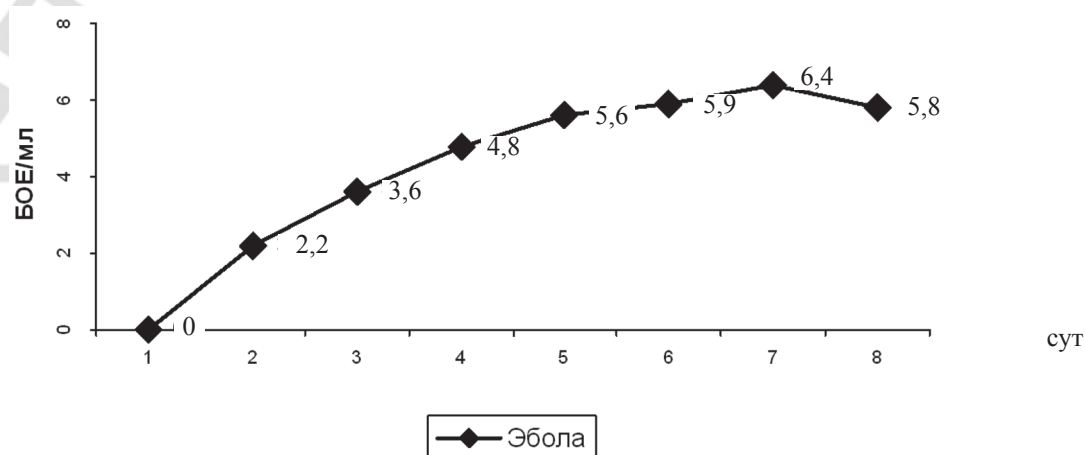


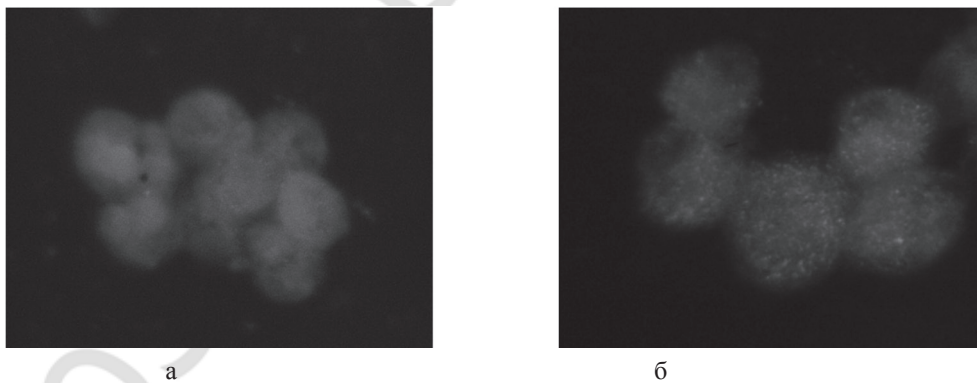
Рисунок 2. — Репродукция вируса Эбола в культуре клеток Vero E6

Нами определена инфекционная активность вируса Эбола по способности формировать негативные колонии (бляшки) под агарозным покрытием (S-признак). Вирус Эбола при размножении в культурах клеток Vero E6 формировал бляшки от 0,7–1 мм, которые появлялись на 6–7-е сут (рисунок 3). Титр вируса Эбола равен 6,4 lg БОЕ/мл.



Рисунок 3. — Негативные колонии (бляшки) вируса Эбола под агарозным покрытием на культуре клеток Vero E6 (б) в равнении с контрольной культурой (а)

Подтверждение подлинности восстановленного после хранения штамма вируса Эбола оценивали с помощью нРИФ. По рекомендациям ВОЗ эталонным диагностическим препаратом считают сыворотку крови реконвалесцента из эпидемического очага заболевания [6]. В качестве референс-сыворотки к вирусу Эбола использовали сыворотку реконвалесцента — № 096023 (Центр по контролю над инфекционными заболеваниями, Атланта, США). В результате постановки нРИФ выявлена локализация специфического антигена с четкой гранулярной структурой в цитоплазме клеток. Яркое гранулярное свечение антигенов вирусов четко просматривается на фоне темного окрашивания структуры клеток в отличие от контрольных культур клеток (рисунок 4), что подтверждает аутентичность штамма.

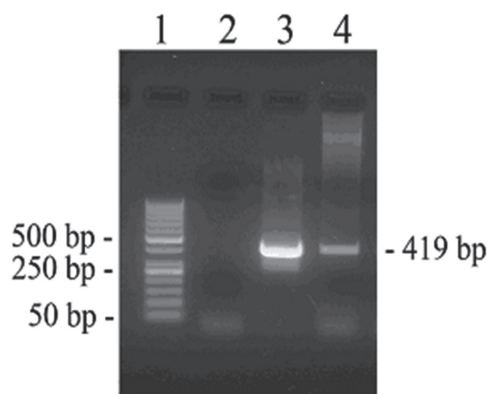


Увеличение x400, окраска: флуоресциинизотиоционат (ФИТЦ)

а — контрольные культуры клеток; б — клетки, инфицированные вирусом Эбола

Рисунок 4. — Иммунофлуоресценция культур клеток Vero E6

Идентификацию восстановленных вирусов проводили также на основании молекулярно-генетических методов исследования — обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами на матрицах РНК, выделенных из культуральной жидкости, содержащей вирус Эбола. В результате постановки ОТ-ПЦР получен ДНК-фрагмент заданного размера — 419 п.о. Амплификация специфического кДНК-фрагмента свидетельствует о наличии РНК вируса Эбола в вирусосодержащей жидкости и подтверждает аутентичность вирусного материала. Данные представлены на рисунке 5.



дорожки: 1 — ДНК-Маркер 50 bp (Thermo Scientific); 2 — отрицательный контрольный образец; 3 — положительный контрольный образец; 4 — результат амплификации на матрице, выделенной из культуральной жидкости, содержащей вирус Эбола, штамм Заир

Рисунок 5. — Результаты идентификации вируса Эбола, выделенного из вируссодержащей культуральной жидкости

Заключение. Восстановлен вирус Эбола, штамм Заир, находившийся на длительном хранении в фонде Специализированной коллекции вирусов и бактерий, патогенных для человека, с использованием перевиваемой культуры клеток Vero E6.

Определена инфекционная активность вируса Эбола по способности формировать негативные колонии (бляшки) на культуре клеток Vero E6 под агарозным покрытием. Титр вируса Эбола равен 6,4 lg БОЕ/мл.

Аутентичность штамма вируса Эбола подтверждена в реакции непрямой иммунофлуоресценции с референс-сывороткой от реконвалесцента и в ОТ-ПЦР со специфическими праймерами на матрицах РНК, выделенных из культуральной жидкости, содержащей вирус Эбола.

Методология коллекционирования патогенных микроорганизмов во многом определяет результаты последующих этапов решения научных и практических вопросов в области инфекционной патологии, в т. ч. и в прикладном аспекте — создание медицинских иммунобиологических препаратов.

Литература

- 1 Диагностика и профилактика особо опасных вирусных инфекций в Республике Беларусь / А. Г. Красько [и др.] // Материалы XII Межгосудар. науч.-практ. конф., Саратов, 25–26 нояб. 2014 г. — Саратов, 2014. — С. 123.
- 2 Заявление ВОЗ по итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении вспышки Эболы 2014г. в Западной Африке [Электронный ресурс]. — Mode of access: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/ebola-20140808/ru/>. — Date of access: 08.08.2014.
- 3 Маркин, В.А. Коллекции патогенных вирусов в решении общебиологических проблем / В.А. Маркин // Журн. микробиологии. — 2007. — № 6. — С. 84–93.
- 4 Национальная коллекция вирусов: изучение методов длительного хранения штаммов / Л.М. Рустомова [и др.] // Достижения медицинской науки Беларуси: рец. науч.-практ. ежегодник. — Минск: ГУ РНМБ, 2005. — Вып. 10. — С. 38.
- 5 Маркин, В.А. Методология коллекционирования патогенов / В.А. Маркин // Вопр. вирусологии. — 2010. — № 5. — С. 4–9.
- 6 Маркин, В.А. Коллекционирование патогенных вирусов: состояние и перспективы проблемы / В.А. Маркин, А.А. Махлай, Т.А. Бектемиров // Вопр. вирусологии. — 1996. — № 6. — С. 281–284.

EBOLA VIRUS REACTIVATION AFTER PROLONGED STORAGE

Rustamova L.M., Krasko A.G., Rodionova L.P., Semenov S.F., Bogdanova N.L., Semizhon P.A., Vladyko A.S.

State Institution “National Science & Practice Centre of Epidemiology and Microbiology”, Minsk, Republic of Belarus

The methods of Ebola virus reactivation after prolonged storage are described in this study. The authenticity of the Ebola virus in the indirect immunofluorescence techniques and reverse transcription polymerase chain reaction with specific primers on RNA template, isolated from the culture medium containing the Ebola virus is confirmed.

Keywords: extremely dangerous viral infections, filoviruses, Ebola virus, storage; reactivation.

Поступила 22.06.2016