

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

ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ I–IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ КАК МЕТОД СОХРАНЕНИЯ ИСХОДНЫХ СВОЙСТВ ШТАММОВ

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь*

В связи с нарастающим антропогенным воздействием на природу, представляется необходимым не только изучение биоразнообразия микроорганизмов на всех уровнях – видовом, популяционном, клеточном и т. д., но и разработка методов его сохранения. Сохранение биоразнообразия микроорганизмов включает 3 важных аспекта:

- мониторинг, т. е. изучение количественного и видового состава микробных популяций в различных экологических нишах и их взаимоотношения с человеком и животными;
- сохранение выделенных культур без потери их свойств с целью дальнейшего использования в биотехнологии, диагностике, разработке противовирусных препаратов и пр.;
- разработка методологии и технологии сохранения микробного разнообразия.

Эволюционные процессы, происходящие в популяциях микроорганизмов, изменяют экологическую ситуацию. Это объясняется рядом факторов:

- особенностями природных условий нашей страны – наличие лесов, озер, болот, что приводит к распространению и устойчивому функционированию очагов природно-очаговых заболеваний (клещевой энцефалит, лимфоцитарный хориоменингит (ЛХМ), геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), болезнь Лайма, бешенство и т. д.) [1,2].

- прохождением через территорию страны путей миграции различных видов птиц и животных, что создает условия для появления экзотических для стра-

ны возбудителей заболеваний: вирус Западного Нила, африканская чума свиней и т. п. [3].

- географическое положение страны – центр Европы, на перекрестке миграционных потоков населения, изменения в социальном поведении людей создает условия для расширения списка возбудителей инфекционных заболеваний человека.

В практическом плане контроля над ситуацией важная роль принадлежит работам по сбору и сохранению патогенных микроорганизмов и созданию коллекции национального уровня, которая располагает культурами патогенных микроорганизмов, циркулирующих в природе. Целью работы при создании коллекции является гарантированное сохранение патогенных для человека микроорганизмов в жизнеспособном состоянии для стандартизации исследований с культурами микроорганизмов. Методология коллекционирования патогенных микроорганизмов, направленная на сохранение и поддержание культур возбудителей, во многом определяет результаты последующих этапов решения научных и практических задач в области инфекционной патологии. Методы сохранения и поддержания штаммов микроорганизмов весьма многочисленны и разнообразны, однако ни один из них не считается на сегодняшний день универсальным. Общепризнанным является факт генетической нестабильности микроорганизмов в процессе культивирования. Даже штаммы одного и того же вида могут по-разному реагировать на используемые методы пассажей и хранения. В теории и практике коллекционирования патогенных микроорганизмов очень важно определить методы выделения и поддержания микроорганизмов для сохранения их природного разнообразия [4, 5].

В технологии культивирования вирусов I-IV групп патогенности нами определены следующие моменты.

Исходным материалом для восстановления вирусов I-IV групп являются либо 10% суспензия инфицированной ткани мозга белых мышей в растворе Хенкса, осветленная центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, либо культуральная вируссодержащая жидкость. Это должен быть генетически однородный материал с точной историей пассажей. Для культивирования вирусов используются перевиваемые клеточные линии почек африканских зеленых мартышек (Vero, Vero E6), клетки карциномы шейки матки человека (Herp-2), фибробластов эмбриона мыши (L-41), выращенные в пластиковых матрицах (Sigma, USA). В качестве поддерживающей используется среда MEM (Sigma, USA), содержащая 10 мМ HEPES, 0,075% NaHCO₃, 2% эмбриональной телячьей сыворотки, прогретой при 56°C в течение 30 мин и 100 мкг/мл гентамицина. Учитывая основные закономерности репродукции вирусов в клеточных линиях для восстановления и накопления вирусного материала, подбирается наиболее благоприятная линия клеток и низкая множественность инфицирования, порядка 0,1-0,01 БОЕ/клетку. Для вирусов I-II групп (арена- и филовирусы) среди всех клеточных систем выбраны линии Vero, Vero E6, в которых происходит эффективное размножение и накопление вирусного материала. Для вирусов III (полиовирусы) и IV групп (вирус кори) линии L-41 и Herp-2, соответственно. Зараженные клеточные линии инкубируют при 37°C в течение 3-5 суток. В куль-

туральной жидкости определяют инфекционную активность вируса методом бляшек под агаровым покрытием на монослое клеток Vero E6. При получении исходного вирусного материала проводится 2-3 пассажа вирусов в перmissive клеточных линиях. При этом инфекционная активность достигается 5-7 lg БОЕ/мл, что является достаточным для последующей лиофилизации и длительного хранения. Наиболее оптимальными режимами хранения вирусосодержащего материала признано хранение при низких температурах (-20°C, -70°C), а жидком азоте, лиофильно высушенными. Способы хранения подбираются индивидуально с учетом особенностей вирусного материала.

Полученные результаты с достаточной уверенностью показывают, что оптимальная схема подготовки материала для длительного хранения должна включать все необходимые элементы, гарантирующие поддержание в жизнеспособном состоянии культур патогенных микроорганизмов. Все коллекционные работы по «освежению» культур микроорганизмов проводятся поэтапно в изолированных боксах, исключающих внесение посторонних возбудителей.

Разработанный алгоритм коллекционирования опасных вирусов направлен на сохранение исходных биологических свойств поддерживаемых в лабораторных условиях конкретных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Распространение клещевых инфекций как функция системы «клещи – перелетные птицы – возбудители болезней»* / А. Н. Алексеев [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. Минск, 2009. Вып. 2. С. 31-36.
2. *Анализ эпидобстановки по клещевому энцефалиту и болезни Лайма в Республике Беларусь за 1999-2008 гг.* / А. Л. Веденьков [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: : сб. науч. тр. Минск, 2009. Вып. 2. С. 54-58.
3. *Львов, Д. К.* Значение вновь возвращающихся инфекций в биобезопасности / Д. К. Львов // *Вопр. вирусол.* 2002. № 5. С. 4-7.
4. *Научное обоспечение и организация деятельности государственных коллекций патогенных бактерий и вирусов в научно-исследовательских учреждениях Роспотребнадзора: протокол заседания Ученого совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 30.09.2009.* М., 2009.
5. *Маркин, В. А.* Коллекции патогенных вирусов в решении общебиологических проблем / В. А. Маркин // *Журн. микробиол.* 2007. № 6. С. 84-93.