

Определение чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к клиническим изолятам энтеровируса человека *Echovirus 11* и *Coxsackievirus B5*

А. В. Алимов, к.м.н., рук. института; О. С. Федотова, в.н.с.; Н. А. Шмелева, н.с.; А. А. Бахарев, к.б.н., с.н.с.; А. В. Резайкин, в.н.с., к.м.н.; П. С. Усольцева, н.с.; Б. С. Имангалиев, м.н.с.; Т. Л. Бахарева, н.с.

Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, г. Екатеринбург

Determining sensitivity of novel animal-derived cell cultures to clinical isolates of human enterovirus *Echovirus 11* and *Coxsackievirus B5*

A. V. Alimov, O. S. Fedotova, N. A. Shmelyova, A. A. Bakharev, A. V. Rezaykin, P. S. Usoltseva, B. S. Imangaliyev, T. L. Bakhareva
Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections of the State Research Centre of Virology and Biotechnology 'Vector',
Yekaterinburg, Russia

Резюме

В лаборатории клеточных культур Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Роспотребнадзора впервые получены и охарактеризованы диплоидные клеточные культуры гортани, легких, почек и мышц плодов свиньи. Проведена оценка чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к наиболее актуальным клиническим изолятам энтеровирусов человека – *Coxsackievirus B5* и *Echovirus 11*. Экспериментальные исследования со штаммом *Coxsackievirus B5* (CB5–8100) установили высокий уровень чувствительности диплоидных клеток гортани и почки к вирусу и отсутствие таковой у клеток легочной и мышечной ткани. Также установлено полное отсутствие чувствительности всех изучаемых клеточных культур к *Echovirus 11* (111/RD). Полученные результаты будут использованы для дальнейшего изучения клеточных культур животного происхождения. Паспортизация новых клеточных культур почки и гортани плодов свиньи откроет новые возможности их широкого использования в вирусологии с целью изучения этиологии энтеровирусных инфекций, обусловленных *Coxsackievirus B5*.

Ключевые слова: диплоидные клеточные культуры плодов свиньи, клинические изоляты энтеровирусов человека *Echovirus 11* и *Coxsackievirus B5*, цитопатический эффект.

Summary

The cell culture laboratory of Ekaterinburg Research Institute of Viral Infections established and characterized diploid cell cultures of fetal porcine larynx, lungs, kidneys and muscles for the first time. Sensitivity of the novel animal-derived cell cultures to the priority clinical isolates of human enterovirus, *Coxsackievirus B5* and *Echovirus 11*, was evaluated. Experimental studies with a *Coxsackievirus B5* (CB5–8100) strain detected high sensitivity to the virus in the diploid laryngeal and renal cells and absence of such sensitivity in the cells of the lung and muscle tissues. We also documented the total absence of sensitivity to *Echovirus 11* (111/RD) in all the cell cultures under study. The results will be used for further studies of animal-derived cell cultures. Certification of the novel fetal porcine renal and laryngeal cells will open up new opportunities for a wide variety of their uses in virology for studying the etiology of enteroviral infections caused by *Coxsackievirus B5*.

Key words: fetal porcine diploid cell cultures, clinical isolates of human enteroviruses *Echovirus 11* and *Coxsackievirus B5*, cytopathic effect.

Введение

В последние годы отмечен рост заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ) [1]. Процессы активной миграции населения и нестабильная эпидемиологическая ситуация в мире создают постоянную угрозу завоза и распространения ЭВИ на территории Российской Федерации. Энтеровирусы способны поражать многие ткани и органы человека (центральную нервную систему, сердце, легкие, печень, почки и др.), что определяет значительный клинический полиморфизм вызываемых ими заболеваний. Особенностью ЭВИ являются схожие клинические проявления болезни, вызываемые различными серотипами энтеровирусов. Наряду с этим одинаковые серотипы могут давать различные клинические формы заболевания [3].

Известно, что для изучения свойств вирусов широко используют органные и клеточные культуры. Применение клеточных культур и линий в вирусологической практике связано с простотой их культивирования, однородностью клеточного состава и возможностью количественного учета клеток [6]. Клеточные культуры представляют собой незаменимую биосистему для титрования вирусов и изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов

вирусного размножения в клетках [2]. Следует отметить, что в настоящее время не существует универсальной культуры клеток (или культуральной системы) для выделения энтеровирусов. Некоторые штаммы энтеровирусов не обладают цитопатогенностью ни для одной из известных культур клеток и могут быть выделены только с использованием эмбриональных клеток человека или чувствительных лабораторных животных, что затратно и сложно осуществимо в условиях практических лабораторий [4].

Цель работы изучение чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к клиническим изолятам энтеровирусов человека *Echovirus 11* и *Coxsackievirus B5*.

Материалы и методы исследования

В работе использованы диплоидные клеточные культуры свиньи, полученные в лаборатории клеточных культур Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций.

Для проведения научных исследований (получение новых клеточных линий) взяты плоды от забракованной, охромевшей, клинически здоровой свиноматки

из благополучного по эпидемической ситуации животноводческого хозяйства Свердловской области. Изъятие и транспортировку матки с плодами проводили при соблюдении принципов этического кодекса международных рекомендаций по проведению биомедицинских исследований с использованием животных (CIOMS).

Клеточные культуры гортани, мышц, почек, легких получили из органов плодов свиньи II триместра супоросности (эмбриональные клетки на поздней стадии развития) методом щадящей трипсинизации и выращивали в среде, состоящей из смеси равных количеств 0,5%-ного раствора гидролизата лактоальбумина и среды ИГЛА с 10%-ной сывороткой крупного рогатого скота.

Для эксперимента использовали культуры после 10-го пассажа в стадии активной пролиферации, выращивали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в виде монослоя в пластиковых культуральных плоскодонных пробирках (TFS, США) емкостью 15 мл. Плотность посева клеток составляла 200 тыс./мл. В качестве среды поддержания использовали питательную среду 199 (ИГЛА).

Штамм 111/RD является клиническим изолятом энтеровируса человека *Echovirus 11*, выделенным от больного серозным менингитом на первичной диплоидной культуре клеток легкого эмбриона человека (ЛЭЧ), с последующей адаптацией к клеткам RD, был охарактеризован ранее [7].

Штамм CB5-8100 – клинический изолят энтеровируса человека *Coxsackievirus B5*, выделенный от больного серозным менингитом на культуре клеток рабдосаркомы человека (RD), был охарактеризован ранее [5].

При заражении клеточных культур почек (ККП), легкого (ККЛ), гортани (ККГ), мышц (ККМ) плодов свиньи концентрация вируса в вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) составляла 10^6 ТЦД₅₀ в 200 мкл. Титром вируса при его определении

в культурах клеток называется то наибольшее разведение вирусосодержащего материала, в котором вирус способен вызвать ТПД у 50% инфицированных культур клеток. Эта величина называется 50%-ной тканевой цитопатической дозой (ТЦД 50).

Чувствительность клеточных культур к энтеровирусам определяли согласно «Руководству по лабораторным исследованиям полиомиелита» Всемирной организации здравоохранения (раздел «Выделение полиовируса и других энтеровирусов») [6]. Клеточный монослой в культуральной пробирке, предварительно отмытый раствором Эрла от среды роста, заражали по 200 мкл ВСЖ, затем добавляли 2,5 мл среды поддержания и инкубировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 5 суток. В контрольную пробирку после предварительной отмывки раствором Эрла добавляли 2,5 мл среды поддержания без вируса и инкубировали аналогично опытным пробиркам. Визуальную оценку цитопатического действия (ЦПД) (округление клеток, дегенерация монослоя, отделение от поверхности стекла) проводили ежедневно с 1-го по 5-й день. При отсутствии (ЦПД) на 5-е сутки проводили второй, а затем и третий слепые пассажи. При отрицательном результате после третьего слепого пассажа клеточную культуру считали нечувствительной к энтеровирусу. Эксперимент по определению чувствительности проводили в четырех повторях.

Степень ЦПД оценивали по проценту клеток в монослое с характерными для энтеровирусов признаками цитопатологии по условной четырехплюсовой шкале: «–» (0% ЦПД); «1+» (< 25%); «2+» (25% до < 50%), «3+» (50% до < 75%) и «4+» (75% до 100%). Затем вычисляли средние величины со стандартными отклонениями. Результаты обрабатывали статистическими методами.

Для исключения ложноположительных результатов, обусловленных дегенерацией клеточного монослоя вследствие контаминации образцов или питательной среды иными цитопатическими агентами или веществами, подтверждения репликации энтеровирусной РНК в чувствительных клеточных культурах, проводили оценку относительной концентрации энтеровирусной РНК в ВСЖ, полученной после переморозки проб третьего пассажа.

Относительную концентрацию энтеровирусной РНК в ВСЖ определяли в ПЦР с регистрацией результатов амплификации в реальном времени с использованием набора реагентов «АмплиСенс Enterovirus-FL» («Интерлабсервис», Россия). Для оценки относительной концентрации энтеровирусной РНК в пробе применяли качественный пороговый метод – величину порогового цикла амплификации (C_t). Интерпретацию результатов тестирования исследуемых образцов проводили в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Пробы, в которых значения C_t не превышали 40, считались положительными.

Результаты и их обсуждение

Клеточные культуры почек (ККП), легкого (ККЛ), гортани (ККГ), мышц (ККМ) плодов свиньи, полученные методом щадящей трипсинизации были изучены в течении трех фаз развития. В первой фазе – это адаптации клеток в первичной культуре, во второй – деление клеток определенное число раз (предел Хейфлика), в третьей – старение клеток, где прекращалась пролиферация, и клетки постепенно дегенерировали и погибали.

Таблица 1
Цитопатическое действие штамма энтеровируса *Coxsackievirus B5* (CB5-8100) на диплоидные культуры клеток плодов свиньи

Диплоидная клеточная культура	Цитопатическое действие энтеровируса <i>Coxsackievirus B5</i> (CB5-8100), %		
	1-й пассаж (% $\pm$ m)	2-й пассаж (% $\pm$ m)	3-й пассаж (% $\pm$ m)
Клеточная культура почек (ККП)	25,0 $\pm$ 4,3	37,5 $\pm$ 4,8	87,5 $\pm$ 3,3
Клеточная культура легких (ККЛ)	0	0	0
Клеточная культура гортани (ККГ)	12,5 $\pm$ 3,3	25,0 $\pm$ 4,3	37,5 $\pm$ 4,8
Клеточная культура мышц (ККМ)	0	0	0

Таблица 2
Величина порогового цикла амплификации энтеровирусной РНК (C_t) в пробах третьего пассажа клинического изолята энтеровируса *Coxsackievirus B5* (штамм CB5-8100) на диплоидных культурах клеток животного происхождения

№ строки	Диплоидная клеточная культура	Проба	C_t
1	ККП	1	24,0*
2		2	22,0*
3	ККГ	1	33,4*
4		2	36,6*
5	ККМ	1	40,0
6		2	Выше 45,0
7	ККЛ	1	Выше 45,0
8		2	Выше 45,0

Предел культивирования клеточных культур не превышал 52 пассажа (предел Хейфлика). Этот факт свидетельствует о том, что клеточные культуры не начали спонтанную трансформацию в гетероплоидные клеточные культуры. Их диплоидность была подтверждена также морфологически и кариологически.

В первой серии опытов проведено изучение чувствительности клеточных культур к штамму CB5–8100. По результатам исследования была выявлена высокая чувствительность ККП к CB5–8100 (табл. 1).

У ККГ ЦПД составил $37,5 \pm 4,7\%$, что характеризует культуру как слабочувствительную. Клеточные культуры легких и клеточные культуры мышц проявили полную резистентность к CB-8100, были нечувствительны.

Результаты были подтверждены методом ПЦР. Репликация РНК штамма CB5–8100 произошла только у ККГ и ККП (табл. 2). Полученные данные подтвердили отсутствие чувствительности штамма CB5–8100 к диплоидным ККМ и ККЛ плодов свиньи.

Вторая аналогичная серия опытов была посвящена изучению чувствительности клеточных культур к штамму E – 111/RD. Однако в ходе эксперимента было установлено полное отсутствие чувствительности изучаемых ККГ, ККМ, ККП, ККЛ к штамму E – 111/RD. Таким образом, в ходе эксперимента была выявлена чувствительность диплоидных клеточных культур почки (ККП) и гортани (ККГ) к штамму

энтеровируса человека *Coxsackievirus B5* (CB5–8100) и отсутствие таковой у культур мышц (ККМ) и легких (ККЛ). Учитывая, что эти культуры являются новыми для практической вирусологии, представляет интерес продолжить изучение спектра их чувствительности к различным серовариантам энтеровирусов. Полученные нами результаты будут в дальнейшем использованы для паспортизации клеточной культуры почки (ККП) как наиболее перспективной к использованию. Рекомендовано ее широкое применение в вирусологической практике с целью диагностики энтеровирусной инфекции, обусловленной актуальным и распространенным на территории РФ штаммом энтеровируса CB5.

Список литературы

1. Анохин В. А., Сабитова А. М., Кравченко И. Э., Мартынова Т. М. Энтеровирусные инфекции: современные особенности // Практическая медицина. Педиатрия. 2014. № 9 (85). С. 52–59.
2. Голубев Д. Б., Соминина А. А., Медведева М. Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. Л.: Медицина. 1976. 55с
3. Канаева О. И. Энтеровирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4. № 1. С. 27–36.
4. Энтеровирусные заболевания: клиника, лабораторная диагностика, эпидемиология, профилактика. Методические указания. МУ 3.1.1.2130–06 (утв. главным государственным санитарным врачом РФ 09.09.2006).
5. Усольцева П. С., Алимов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г., Новоселов А. В. Роль неонатального Fc рецептора в депротенинизации вирусов ECHO и Коксаки A9 // Вопросы вирусологии. 2019. Т. 64, № 3. С. 132–139.
6. Hematian A. et al. Traditional and modern cell culture in virus diagnosis // Osong public health and research perspectives. 2016. Т. 7. № 2. С. 77–82.
7. Novoselov A. V., Rezaykin A. V., Sergeev A. G., Fadeyev F. A., Grigoryeva J. V., Sokolova Z. I. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. Virus Res. 2012. 166 (1–2): 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.007>.

Для цитирования: Алимов А. В., Федотова О. С., Шмелева Н. А., Бахарева А. А., Резайкин А. В., Усольцева П. С., Иманалиев Б. С., Бахарева Т. А. Определение чувствительности новых клеточных культур животного происхождения к клиническим изолятам энтеровируса человека Echovirus 11 и Coxsackievirus B5. Медицинский алфавит. 2020; (18): 17–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-18-17-19>.

For citation: Alimov A. V., Fedotova O. S., Shmelyova N. A., Bakharev A. A., Rezaykin A. V., Usoltseva P. S., Imangaliyev B. S., Bakhareva T. L. Determining sensitivity of novel animal-derived cell cultures to clinical isolates of human enterovirus Echovirus 11 and Coxsackievirus B5. Medical alphabet. 2020; (18): 17–19. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-18-17-19>.



ХI ВСЕРОССИЙСКИЙ ЕЖЕГОДНЫЙ КОНГРЕСС ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ У ДЕТЕЙ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА

12-13 ОКТЯБРЯ 2020 • ONLINE



НАУЧНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ:

- Вопросы эпидемиологии и социальной значимости инфекционных болезней в педиатрии. Организация медицинской помощи при инфекционных болезнях у детей;
- Нейроинфекции;
- Вирусные инфекции;
- Бактериальные инфекции;
- Паразитарные болезни;
- Микозы;
- Госпитальная инфекция;
- Проблема резистентности возбудителей и рациональная антимикробная химиотерапия;
- Врожденные инфекции;
- Профилактика инфекционных заболеваний у детей.

Подробная информация
размещена на сайте
www.congress-ph.ru



ДНКЦИБ ФМБА России
+7 (812) 347 6453; +7 (812) 234 9691
scs@niidi.ru, niidi@niidi.ru
www.niidi.ru



СПБ НОО «Центр
изучения инфекций»
+7 (812) 3476453
E-mail: scs@niidi.ru

ICS INTERNATIONAL
CONGRESS
SERVICE

ООО «Ай Си Эс»
+7(812) 677 31 56
welcometo@congress-ph.ru
www.medicine-congress.ru