

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КОШЕК НА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

Е. Г. Кокорина¹, Э. И. Элизбарашвили²

¹ Ведущий научный сотрудник, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия, e-mail: babushka.karlsona@mail.ru

² Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты сравнительной оценки культуральных свойств вируса инфекционного ринотрахеита кошек на первичных и перевиваемых культурах клеток «кошачьего» происхождения (ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg). Установлено, что репродукция вируса инфекционного ринотрахеита, независимо от способа заражения и метода культивирования, носила закономерный характер и была практически равной в чувствительных культурах клеток. Максимальное проявление цитопатического эффекта (свыше 75% дегенерации монослоя) во всех видах культур клеток было отмечено через 48–72 ч культивирования. Однако наибольшее накопление вируса инфекционного ринотрахеита кошек штамма «Гранд» зависит от времени предварительной адсорбции при заражении в дозе 5,5 lg TCID₅₀/мл монослойных культур клеток при культивировании роликовым методом и поддержании pH среды на уровне 7,0–7,4. Установлено, что однократное замораживание культурального вируса при температуре –60 °C по окончании цикла культивирования (в течение 60–72 ч) и его размораживание достоверно повышало титр на 0,5 lg TCID₅₀/мл.

Ключевые слова: инфекционный ринотрахеит кошек, репродукция вируса, первичная культура клеток, перевиваемая культура клеток.

UDC 619:578.835.21:57.082.26

COMPARATIVE STUDIES OF FELINE VIRAL RHINOTRACHEITIS VIRUS FOR ITS REPLICATION PROPERTIES IN DIFFERENT CELL CULTURES

Ye. G. Kokorina¹, E. I. Elizbarashvili²

¹ Leading Researcher, FGBI "VGNKI", Moscow, Russia, e-mail: babushka.karlsona@mail.ru

² Leading Researcher, Candidate of Sciences (Biology), FGBI "VGNKI", Moscow, Russia

SUMMARY

The results of comparative studies of feline viral rhinotracheitis virus for its culture properties in primary and continuous cell cultures of feline origin (FK, FK (subculture), CrFK, FS, CC-81, FC/Tg) are presented. It was found that viral rhinotracheitis virus replication, irrespective of the route of infection and the culture technique, was consistent and practically equal in susceptible cell cultures. The most pronounced cytopathic effect (more than 75% monolayer degeneration) was observed in all types of cell cultures in 48–72 hours of cultivation. However, the accumulation of feline viral rhinotracheitis virus Grand strain was highest when preliminary adsorption occurred within the specified period of time, monolayer cell cultures were infected with the virus at a dose of 5.5 lg TCID₅₀/ml and roller bottle cultivated, and the pH of the medium was maintained at 7.0–7.4. Single freezing of the virus at a temperature of minus 60 degrees Celsius upon the completion of the cultivation cycle (during 60–72 hours) and its thawing were found to significantly increase the virus titre by 0.5 lg TCID₅₀/ml.

Key words: feline viral rhinotracheitis, virus replication, primary cell culture, continuous cell culture.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционный ринотрахеит кошек (Feline viral rhinotracheitis, вирусный ринит кошек, эпизоотическая кориза, герпес кошек, «сопящий трахеит») (ИРТ) – широко распространенное контагиозное заболевание, вызываемое герпесвирусом FeHV-1, относящимся к семейству *Herpesviridae*. Герпесвирусная инфекция по своей значимости занимает одно из ведущих мест среди инфекционных заболеваний кошек.

Синдром поражения верхних дыхательных путей впервые был выделен как самостоятельное заболевание у котят и описан в США R. A. Grandell и соавт. в 1958 г. [3, 4]. В России выделение вируса с установлением его этиологической роли было осуществлено сотрудниками ФБГУ «ВГНКИ» в 1995 г. [2].

При данном заболевании большую роль играет разработка современных высокоэффективных биопрепаратов для специфической профилактики. Изучение репродукции инфекционного ринотрахеита кошек в клеточных культурах гомологичного происхождения и оптимизация параметров культивирования являются актуальной задачей.

Целью работы было изучение культуральных и инфекционных свойств вируса ринотрахеита кошек, выращенного на гомологичных первичных и постоянных клеточных линиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали культуральный штамм «Гранд» вируса ринотрахеита кошек [2]. В опытах по изучению чувствительности различных культур клеток к вирусу ИРТ использовали как первичные и субкультуры клеток почки котенка (ПК, СПК), так

и перевиваемые культуры клеток селезенки (FS), почки (CrFK), эпителия языка (FC/Tg) и клеток эмбриона кошки, трансформированных вирусом саркомы мышей Молоди (CC-81) [1].

В качестве ростовой среды использовали питательные среды ГЛА/х, DMEM, MEM, Игла MEM с однократным и двойным набором аминокислот с добавлением 5–10% сыворотки крови плодов коровы, L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали при $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. В качестве поддерживающей среды использовали те же среды без сыворотки.

Культуру клеток выращивали в матрасах и флаконах различной емкости. Для роллерного культивирования использовали двухлитровые бутыли.

При стационарном культивировании посадочная концентрация первично-трипсинизированных культур клеток была 300 тыс. кл/мл, а перевиваемых – 70 тыс. кл/мл, при роллерном – 700 тыс. кл/мл и 150 тыс. кл/мл соответственно.

При культивировании вируса ИРТ в культурах клеток использовали среды, имеющие pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 и 7,8.

Культуры клеток заражали вирусом из расчета $3,5 - 5,0 \text{ Ig TCD}_{50}$ на 1 мл суспензии.

Использовали два метода заражения культур клеток.

1. Заражение монослойной культуры клеток – вирус вносили на полностью сформированный клеточный монослой 3–5-суточных первичных и 3–4-суточных перевиваемых культур клеток. Заражение проводили без предварительной адсорбции вируса клетками или же с адсорбцией (контактом) в течение 30, 60 и 120 мин. Контакт выдерживали при температуре $37 ^\circ\text{C}$. После этого доливали необходимый объем поддерживающей среды. Для контроля оставляли незараженную культуру, в которой меняли только среду.

Ежедневно просматривали монослой на наличие цитопатических изменений: изменения формы клеток, наличия и степени их отторжения от стекла.

2. Заражение суспензии клеток – вирус вносили в суспензию клеток при их посадке. Контроль осуществляли, как в предыдущем описании, ежедневно оценивая характер клеточных изменений.

При заражении культур клеток для изучения динамики накопления вируса ИРТ отбирали пробы культуральной жидкости сразу после внесения вируса, а затем с интервалом 24 ч в течение всего процесса культивирования (120 ч).

Матрасы и роллерные бутыли переносили в термальную комнату или термостат для дальнейшего культивирования $((37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C})$.

Применяли два метода культивирования.

1. Роллерный метод – перемешивание осуществляли на роллерной установке Wheaton (США) в двухлитровых бутылках (Rollerbottle Cellmaster Cat. № 680060) фирмы Greiner Bio-One (Германия), которые вращали со скоростью 8–12 об/час.

2. Стационарный метод – клеточную суспензию вносили в культуральные сосуды и выращивали без перемешивания.

Матрасы укладывали горизонтально. pH среды поддерживали на уровне 7,2–7,4 с помощью гликолевого буфера. Культуры клеток, как зараженные, так и незараженные, ежедневно просматривали под микроскопом при малом увеличении на наличие или отсутствие цитопатогенного эффекта.

Инфицированные культуры клеток контролировали по интенсивности цитопатического эффекта (ЦПД). Изменения клеточного монослоя условно обозначали в крестах:

+ – появление 25% отдельных очагов клеточной дегенерации;

++ – до 50%;

+++ – до 75%;

++++ – полная дегенерация поверхности монослоя.

При наличии свыше 75% дегенерации монослоя вирусодержащую суспензию замораживали при $-60 ^\circ\text{C}$ до следующего пассажа.

Определение инфекционной активности вируса ИРТ проводили микрометодом в 96-луночных культуральных планшетах (Costar) с использованием не менее четырех параллельных рядов.

Для титрования вируса готовили 10-кратные его разведения (от 10^{-1} до 10^{-8}) на поддерживающей среде. Каждым разведением вируса, начиная с 10^{-8} , заражали по четыре лунки.

Из каждой лунки с культурой удаляли ростовую среду и вносили 0,2 мл соответствующего разведения вируса. Каждым разведением вируса, начиная с 10^{-8} , заражали по четыре лунки. В качестве контроля служили незараженные четыре лунки со сформировавшимся клеточным монослоем. Результаты титрования учитывали в течение 7 сут инкубирования в CO_2 -инкубаторе при $37 ^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 .

Инфекционный титр вируса выражали в TCD_{50} (50%-я тканевая цитопатическая доза) и рассчитывали по методу Рида и Менча.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований по изучению чувствительности различных культур клеток к вирусу ИРТ представлены в таблице 1.

Установлено, что репродукция вируса на культурах клеток ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg носила закономерный характер. Статистически достоверных отличий, касающихся большей чувствительности какой-либо из перечисленных культур клеток к изучаемому вирусу ИРТ, не отмечено. При одинаковых условиях культивирования и заражения различие по этому показателю не превысило $0,2 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{мл}$.

Размножение вируса сопровождалось проявлением ЦПД. Оно наблюдалось с первого пассажа вируса и было однотипным в чувствительных культурах клеток.

Таблица 1
Инфекционная активность штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в гомологичных первичных и перевиваемых культурах клеток
($n = 3$)

Культура клеток	Доза заражения	Количество пассажей	Титр вируса, $\text{Ig TCD}_{50}/\text{мл}$
ПК	$5,5 \text{ Ig TCD}_{50}/\text{мл}$	5	$7,44 \pm 0,06$
СПК		5	$7,50 \pm 0,10$
CrFK		5	$7,39 \pm 0,06$
FS		5	$7,50 \pm 0,10$
CC-81		5	$7,44 \pm 0,06$
FC/Tg		5	$7,30 \pm 0,17$

Таблица 2

Оценка различных методов заражения и способов культивирования штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в культурах клеток CrFK и FS при 48–72 ч культивирования

$n = 3$

Способ культивирования	Метод заражения	Культура клеток	Доза заражения	Титр вируса, lg TCID ₅₀ /мл
Роллерный	Монослой	CrFK	5,5 lg TCID ₅₀ /мл	7,71 ± 0,11
	Суспензия			5,78 ± 0,11
Стационарный	Монослой			6,61 ± 0,06
	Суспензия			5,11 ± 0,11
Роллерный	Монослой	FS		7,78 ± 0,11
	Суспензия			5,89 ± 0,22
Стационарный	Монослой			6,72 ± 0,15
	Суспензия			5,61 ± 0,06

Первые признаки характерного ЦПД, типичного для герпесвируса, отмечали через 24 ч после заражения монослоя. Оно выражалось в набухании и округлении клеток, но при сохранении целостности монослоя. Уже через 36 ч с момента заражения культуры клеток цитопатический эффект характеризовался образованием отдельных очагов больших округлых клеток. В начале процесса ЦПД имело очаговый характер, а затем диффузный. Далее происходила быстро прогрессирующая деструкция монослоя, сопровождавшаяся постепенным отторжением клеток и образованием пустот. Максимальное проявление ЦПД (свыше 75% дегенерации монослоя) и накопление вируса во всех видах культур клеток было отмечено через 48–72 ч ($7,3\text{--}7,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$).

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования культур клеток гомологичного происхождения (ПК, СПК, CrFK, FS, CC-81, FC/Tg) для культивирования в них вируса ИРТ кошек.

Дальнейшие исследования заключались в изучении инфекционной активности вируса ИРТ и сроков максимального накопления в культурах клеток, влияния на эти показатели способа заражения и метода культивирования, дозы заражения, срока предварительной

адсорбции заражающего вируса, значения pH среды и влияния способа замораживания и размораживания вирусосодержащих жидкостей с целью выделения вируса из зараженных клеток.

Результаты сравнительного изучения инфекционной активности вируса ИРК, выращенного в роллерных и стационарных условиях, в зависимости от метода культивирования и способа заражения, представлены в таблице 2.

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что накопление вируса зависело от используемого метода культивирования и способа заражения клеток.

Титр вируса был максимальным при заражении монослойных культур клеток. В частности, в клеточных линиях CrFK и FS при роллерном культивировании он составил $7,71 \pm 0,11$ и $7,78 \pm 0,11 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, в стационарных условиях $6,61 \pm 0,06$ и $6,72 \pm 0,15 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ соответственно. Заражение суспензии клеток тех же линий не позволило получить сбора вируса с титром, превышающим названные показатели: при роллерном культивировании он составил $5,78 \pm 0,11$ и $5,89 \pm 0,22 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$, а при стационарном – $5,11 \pm 0,11$ и $5,61 \pm 0,06 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ соответственно. Полноценный монослой при этом не сформировался.

Таблица 3

Динамика накопления штамма «Гранд» вируса ИРТ кошек в зависимости от дозы заражения и времени культивирования в постоянной линии клеток CrFK

Доза заражения $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$	Показатели	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$			
		Срок культивирования, ч			
		48	72	96	120
5,5	$M \pm m$	$7,00 \pm 0,14$	$7,10 \pm 0,08$	$6,92 \pm 0,16$	$6,54 \pm 0,08$
	p	$> 0,5$	контроль	$> 0,4$	$> 0,005$
4,5	$M \pm m$	$6,67 \pm 0,10$	$6,75 \pm 0,08$	$6,63 \pm 0,04$	$6,42 \pm 0,05$
	p	$> 0,5$	контроль	$> 0,2$	$> 0,01$
3,5	$M \pm m$	$5,37 \pm 0,10$	$5,84 \pm 0,10$	$6,38 \pm 0,13$	$6,08 \pm 0,02$
	p	$< 0,001$	$< 0,001$	$< 0,001$	$> 0,05$

Таблица 4
Влияние предварительной адсорбции на накопление штамма «Гранд» вируса ИРТ в культуре клеток CrFK при 60–72 ч культивирования
 $n = 4$

Показатели	Время адсорбции, мин			
	Без адсорбции (контроль)	30	60	120
Доза заражения	5,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл			
Титр вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл $M \pm m$	6,54 ± 0,04	6,59 ± 0,05	7,00 ± 0,14	7,08 ± 0,16
p	–	> 0,4	> 0,01	> 0,01

Таблица 5
Репродукция штамма «Гранд» вируса ИРТ в культуре клеток CrFK при различных значениях pH среды
 $n = 3$

Значение pH среды	Доза заражения	Накопление вируса, Ig ТЦД ₅₀ /мл	Существенность различий (p)
6,8	5,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл	5,61 ± 0,06	< 0,001
7,0		7,00 ± 0,19	> 0,5
7,2 (контроль)		7,00 ± 0,19	–
7,4		7,11 ± 0,11	> 0,5
7,6		5,89 ± 0,11	< 0,005

Изучение динамики накопления вируса ИРТ в зависимости от дозы заражения и времени культивирования в клетках CrFK проводили далее с интервалом 24 ч в течение 4 сут (табл. 3).

Анализ полученных результатов показал, что титр накопления вируса тем выше, чем больше доза заражающего вируса. Следует отметить, что срок максимального накопления вируса при минимальной дозе заражения (3,5 Ig ТЦД₅₀/мл) сдвинулся до 4 сут. Таким образом, было показано, что доза заражения влияла главным образом на время накопления максимального количества вируса. Доза вируса 5,5 Ig ТЦД₅₀/мл обеспечивала накопление вируса ИРТ через 48–72 ч культивирования в пределах (7,0 ± 0,14)–(7,1 ± 0,08) Ig ТЦД₅₀/мл.

Немаловажное значение в оптимальной репродукции вирусов животных имеет фактор предварительного контакта (адсорбции) вируса с монослоем исследуемых клеточных линий. В настоящей работе было изучено влияние времени контакта (адсорбции) концентрата штамма «Гранд» вируса ИРТ с монослоем культуры клеток CrFK.

Результаты опытов представлены в таблице 4.

Как видно из таблицы, культивирование вируса без предварительной адсорбции клетками и после 30-минутной адсорбции сопровождалось невысоким накоплением вируса, не превышающим (6,54 ± 0,04)–

(6,59 ± 0,05) Ig ТЦД₅₀/мл. Тогда как адсорбция вируса клетками в течение 60–120 мин обеспечивала максимальное накопление вируса в титрах (7,00 ± 0,14)–(7,08 ± 0,16) Ig ТЦД₅₀/мл.

Общеизвестно, что выбор оптимального pH среды обеспечивает благоприятные условия для размножения вирусов в клетках. Значения pH среды для разных вирусов варьируют в достаточно широком диапазоне в зависимости от типа клеток (от 6,8 до 7,6).

Было установлено, что поддерживающая среда со значениями pH от 7,0 до 7,4 обеспечивает размножение вируса ИРТ в культуре клеток CrFK в наибольших титрах (табл. 5).

При проведении исследований было установлено, что однократное замораживание культурального вируса при температуре –60 °С по окончании цикла культивирования (в течение 60–72 ч) достоверно повышало его титр на 0,5 Ig ТЦД₅₀/мл. При 2–3-кратном замораживании и оттаивании титр вируса почти не изменялся.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичные и субкультуры клеток почек котят, перевиваемые клеточные линии CrFK, FS, CC-81, FC/Tg в равной степени чувствительны и пригодны для культивирования вируса инфекционного ринотрахеита кошек, где он реплицируется с проявлением выраженного ЦПД.

– Накопление вируса было максимальным ((7,71–7,78 ± 0,11) Ig ТЦД₅₀/мл) при следующих условиях:

- заражение монослойных культур клеток;
- культивирование роллерным методом;
- поддержание pH среды в пределах от 7,0 до 7,4;
- доза заражения 5,5 Ig ТЦД₅₀/мл;
- предварительная адсорбция вируса клетками в течение 60–120 мин;
- время культивирования 48–72 ч;
- однократное замораживание при –60 °С и размораживание вирусного сбора по окончании цикла культивирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каталог. Российская коллекция клеточных культур (РККК) / ред. коллегия: Г. П. Пинаев, Г. Г. Полянская, Г. А. Сакута, М. С. Богданова. – СПб., 2004. – 315 с.
2. Ринотрахеит кошек / Э. И. Элизбарашвили, М. М. Рахманина, В. И. Уласов, Ю. И. Могильный // Ветеринария. – 1995. – № 9. – С. 50–52.
3. Crandell R. A., Madin S. H. Experimental studies on a new feline virus // Am. J. Vet. Res. – 1960. – Vol. 21. – P. 551–556.
4. Crandell R. A., Maurer F. D. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1958. – Vol. 97, No. 3. – P. 487–490.

REFERENCES

1. Catalogue. Russian cell culture collection (RCCC). Ed. G. P. Pinayev, G. G. Polyanskaya, G. A. Sakuta, M. S. Bogdanova. SPb., 2004 (in Russian).
2. Feline rhinotracheitis. E. I. Elizbarashvili, M. M. Rakhmanina, V. I. Ulasov, Yu. I. Mogilny. Veterinariya. 1995; 9: 50–52 (in Russian).
3. Crandell R. A., Madin S. H. Experimental studies on a new feline virus. Am. J. Vet. Res. 1960; 21: 551–556.
4. Crandell R. A., Maurer F. D. Isolation of a feline virus associated with intranuclear inclusion bodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958; 97 (3): 487–490.

Поступила 16.07.18

Принята в печать 16.08.18