

37. Pawlotsky J. M., Dahari H., Neumann A. U. et al. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2004; 126: 703—714.
38. Pawlotsky J. M. The results of phase III clinical trial with telaprevir and boceprevir presented at The Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. *Gastroenterology* 2011; 140: 746—754.
39. Robbins P. S., Myers G., Howard C. et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch. Virol.* 1998; 143: 2493—2503.
40. Robinson M., Tian Y., Delaney W. E. et al. Preexisting drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals. *PNAS USA*. 2011; 108: 10290—10295.
41. Rodriguez-Torres M., Lawitz E., Conway B. et al. Safety and antiviral activity of the HCV non-nucleoside polymerase inhibitor VX-222 treatment-naïve genotype 1 HCV-infected patients. *J. Hepatol.* 2010; 52 (suppl. 1): S14.
42. Roulot D., Bourcier V., Grando V. et al. Epidemiological characteristics and response to peginterferon plus ribavirin treatment of hepatitis C virus genotype 4 infection. *J. Viral. Hepatol.* 2007; 14: 460—467.
43. Sarasin-Filipowicz M., Oakeley E. J., Duong F. H. et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *PNAS USA*. 2008; 105: 7034—7039.
44. Shih I., Vliegen I., Peng B. et al. Mechanistic characterization of GS-9190 (tegobuvir), a novel non-nucleoside inhibitor of HCV NS5B polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 4196—4203.
45. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42: 962—973.
46. Suppiah V., Moldovan M., Ahlensiel G. et al. IL-28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1100—1104.
47. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome-wide association with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1105—1109.
48. Taylor D. R., Shi S. T., Romano P. R. et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PRK by HCV E2 protein. *Science*. 1999; 285: 107—110.
49. Thomas D. L., Thio C. L., Martin M. P. et al. Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009; 461: 798—801.
50. Yu X., Qiao M., Atanasov I. et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*. 2007; 367: 126—134.
51. Yuan H. J., Jain M., Snow K. K. et al. Evolution of hepatitis C virus NS5A region in breakthrough patients during pegylated interferon and ribavirin therapy. *J. Viral Hepatit.* 2010; 17: 208—216.

Поступила 22.03.12

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 578.833.3:578.23].083.2

Л. В. Урываев, К. С. Ионова, А. В. Дедова, Л. В. Дедова, Т. К. Селиванова, Н. А. Парасюк, М. В. Мезенцева, Л. В. Костина, Е. А. Гущина, Р. Я. Подчерняева, Т. В. Гребенникова

Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва

Проанализирована частота контаминации клеточных линий и эмбриональных сывороток телят (ЭТС), используемых в биологических и вирусологических исследованиях, нецитотоксичным пестивирусом (поп-ср-BVDV — bovine viral diarrhea virus) и микоплазмами. С использованием моноклональных антител к гликопротеину оболочки вириона BVDV был выявлен в 33% образцов клеток (из 131 клеточной линии и отливок) и более чем в 60% случаев — в ЭТС (из 37 проверенных партий). Установлена способность вируса инфицировать широкий спектр клеток разной видовой, тканевой и органной специфичности. Выявлена контаминация среди изученных 69 клеточных культур разными видами микоплазм в 20% случаев. Показано, что BVDV-контаминация клеток влияет не только на показатели функциональной активности клеточного генома (уровни активности генов цитокинов и экспрессия генов ИФН- α , - β , - γ), но и репродукцию вирусов.

Ключевые слова: клеточные линии, фетальная сыворотка телят, контаминация BVDV и микоплазмами, ОТ-ПЦР

Analysis of the Cell Tissue Culture Contamination with the Bovine Viral Diarrhea Virus and Mycoplasmas

L. V. Uryvaev, K. S. Ionova, A. V. Dedova, L. V. Dedova, T. K. Selivanova, N. A. Parasjuk, M. V. Mesentseva, L. V. Kostina, E. A. Gushina, R. Ja. Podchernjaeva, and T. V. Grebennikova

Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

Different cell tissue cultures and commercial fetal calf sera (FCS) used in biological and virological research were screened for the bovine viral diarrhea virus (BVDV, Pestivirus genus, Flaviviridae family) and mycoplasma contamination. BVDV was detected using RT-PCR and indirect immunofluorescence (with monoclonal antibodies) methods in 33% cases of the studied cell lines and in >60% cases of FCS. BVDV was shown to present and reproduce in high spectra of human cell lines, as well as in monkey, pig, rabbit, goat, dog, and cat cells at high

levels (up to 100-1000 genome-equivalent copies per cell) and reached up to 10^3 - 10^7 genome-equivalent copies per serum ml. The molecular mechanisms of the long virus persistence without definite signs of destruction should be studied.

Key words: cell tissue cultures, fetal calf sera, contamination, bovine viral diarrhea virus, RT-PCR, indirect immunofluorescence analysis

Создание способов культивирования соматических клеток вне организма в искусственных питательных средах оказало огромное влияние на развитие исследований биологии клетки и прикладное применение полученных знаний в вирусологии, что привело к принципиальным изменениям методов масштабного культивирования клеток, используемых для диагностики вирусных инфекций, выделения и идентификации вирусов. Контроль качества клеточных линий, применяемых как субстраты при создании живых вакцин и инновационных разработок с использованием стволовых клеток, сегодня приобретает особое значение [4].

Одним из главных компонентов питательных сред являются сыворотки крови крупных животных (чаще всего крупного рогатого скота — КРС), которые могут быть контаминированы возбудителями вирусных инфекций с хроническим и/или латентным течением (пестивирусы, вирусы репродуктивного и респираторного заболевания КРС, лейкоза коров, герпесвирусы, антеловирусы и др.) [8, 9, 18]. Отсутствие постоянного контроля за производственными партиями сывороток приводит к контаминации клеточных линий присутствующими в сыворотках КРС разными патогенами. Из вирусных патогенов наиболее часто клеточные линии контаминированы пестивирусом BVDV (bovine viral diarrhea virus) — вирусом диареи — болезни слизистых оболочек КРС [30].

В последние 15—20 лет пестивирусные инфекции широко распространились в крупных животноводческих хозяйствах мира (Европа, Америка, Австралия, Япония) [16, 18, 23] и нашей страны [1—3, 7]. В ряде случаев BVDV рассматривается как эндемичный патоген для отдельных регионов и даже стран [13, 21, 29], а инфицированность поголовья КРС в отдельных хозяйствах достигает 70-90%. Чаще стали появляться также сообщения о контаминации клеточных культур этими вирусами, в том числе атипичными формами (HoBi-подобными) [10, 29].

Пестивирусные заболевания относятся к новым и возвращающимся инфекциям [23, 27]. Вирус диареи — болезни слизистых оболочек КРС — BVDV (семейство Flaviviridae, род *Pestivirus*) вызывает заболевания молодых и взрослых животных, передается контактным (в том числе со слюной), половым и путем *in utero* [12]. Имеется сообщение о выявлении вируса даже в объединенных пробах молока от коров (bulk tank milk) [16]. Симптоматика инфекции весьма разнообразна: от субклинических форм персистентной инфекции до острого поражения слизистой оболочки кишечника, острой диареи, острого геморрагического синдрома, тяжелой пневмонии, пирексии, анорексии, нарушения развития плода; в исходе — иммуносупрессия, иногда летальный исход [1].

Выделяют два основных генотипа BVDV, каждый из которых в зависимости от действия на клетку встречается в виде двух биотипов, — цитопатогенного (cp-BVDV 1 и cp-BVDV 2) и нецитопатогенного (non-cp-BVDV 1 и non-cp-BVDV 2). Только биотип non-cp-BVDV вызывает внутриутробное заражение плода, у которого персистентная инфекция развивается в случае его инфицирования еще до созревания адаптивной иммунной системы [12].

Вирионы BVDV диаметром 60—70 нм имеют липидную оболочку с встроенными в нее гликопротеинами E^{RNS} (gp44/48), E1 (gp33), E2 (gp55). Одноцепочечная положительной полярности геномная РНК (~12,5 kb в длину) кодирует вирусный полипротеин (~3900 а.о.), нарезающийся ко- и посттрансляционно клеточными и вирусными протеазами. Маркерами для обнаружения BVDV-инфекции в клетках и сыворотках крови являются специфические антитела, белки вириона и геномная РНК [12].

Микоплазмы. Среди разных видов бактерий микоплазмы (класс Mollicutes) имеют наименьшую величину генома, лишены оболочки, а виды родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* часто контаминировывают первичные и перевиваемые клеточные линии [11]. Они могут продолжать длительное время персистировать в клетках эукариот без признаков клеточной патологии, а в организме человека вызывают различные воспалительные синдромы [21]. Несмотря на меры предосторожности и систематический мониторинг, микоплазму периодически выявляют в клеточных субстратах, ветеринарных и медицинских вирусных препаратах и вакцинах [25, 26]. Сообщается, что исследование 200 коллекционных клеточных линий человека, обезьян, мышей, хомячков и крыс с использованием ОТ-ПЦР с универсальными праймерами позволило выявить контаминацию до 20% клеток разными видами микоплазм [14].

Следствием инфекции микоплазмами являются снижение пролиферации клеток, нарушение продукции интерферонов и других цитокинов, замедленное формирование монослоя, агглютинация при культивировании клеток в суспензии. Отсутствие сформированной клеточной стенки обеспечивает длительную персистенцию микоплазмы в клетке с накоплением до более 1000 частиц/кл. Для обнаружения микоплазм в клеточных культурах используют цитохимические методы, а в последние годы — метод полимеразной цепной реакции [22].

Проведено исследование произвольно выбранных образцов клеточных линий и отливок из коллекций клеточных культур Института вирусологии им. Д.И.Ивановского (коллекция включена в каталог Всесоюзной коллекции клеточных культур (1991) и Европейский каталог клеточных линий человека

Контактная информация:

Урываев Леонид Викторович, д-р мед наук, проф., чл.-кор.; e-mail: uryvaev_lv@mail.ru

и животных (1993), а также из других источников, включая привезенные из-за рубежа, с целью анализа их контаминации двумя наиболее часто встречающимися патогенами: вирусом диареи — болезни слизистых оболочек коров BVDV и микоплазмами, вызывающими хроническую инфекцию клеток без развития цитопатического эффекта, что затрудняет их обнаружение неспецифическими морфологическими методами.

Наша работа выполнена в рамках контроля качества клеточных линий разного происхождения с целью обозначить масштабы контаминации клеточных линий разных видов животных и разных типов тканей.

Материалы и методы

Клеточные линии. В случае использования монослойной культуры, клетки предварительно трижды промывали TN-буфером (0,01 М трис-HCl pH 7,2 и 0,14 М NaCl), затем отмывали раствором версена с добавлением хемопсина для отслоения клеток от подложки, осаждали их центрифугированием при 4°C в течение 5—7 мин при 1000—1500 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в 5 мл TN-буфера. Осаждение — ресуспендирование клеток повторяли 3 раза. Затем к осадку клеток добавляли 500 мкл 0,14 М NaCl и равный объем лизирующего буфера из набора «Ветбиохим».

Клетки, хранившиеся в жидком азоте (стандартная концентрации 500 000 кл/мл), быстро размораживали при 37°C, трижды отмывали 5-кратным объемом среды 199, подсчитывали в камере Горяева, а затем лизировали для последующего выделения РНК.

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли из монослоя клеток с использованием неорганического носителя и набора для выделения «тест-системы для обнаружения вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)» («Ветбиохим», Россия) по методике производителя.

Для выделения вирусной РНК из эмбриональных телячьих сывороток (ЭТС) КРС использовали по 50—100 мкл сыворотки, применяя тризол согласно методике производителя («Sigma», Германия).

Суммарную ДНК выделяли из монослоя клеток, после их отслоения от подложки и осадения при 4°C в течение 10 мин и 1500 об/мин. Затем клетки суспендировали в 200 мкл 0,14 М NaCl и добавляли 600 мкл лизирующего буфера из набора «Ветбиохим», (Россия), далее — по методике производителя.

Аmplификация генома ВД. Для выявления генома ВД КРС использовали «тест-систему для обнаружения вируса диареи (ВД) крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции».

ОТ-ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл РНК, 10 пмоль каждого праймера для ПЦР-I, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 10 мМ трис-HCl (pH 9,0), 50 мМ KCl, 0,1% тритон X-100, 1,5 мМ MgCl₂. Использовали следующие параметры ПЦР: (50°C — 50 мин, 94°C — 5 мин) — 1 цикл, (94°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 20 с) — 30 циклов (94°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 5 мин) — 1 цикл. После ОТ-ПЦР проводили второй раунд амплификации.

ПЦР-II выполняли в конечном объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл продукта ОТ-ПЦР,

10 пмоль каждого праймера для ПЦР-II, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, 10 мМ трис-HCl (pH 9,0), 50 мМ KCl, 0,1% тритон X-100, 1,5 мМ MgCl₂. Использовали следующие параметры ПЦР: (94°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 20 с) — 30 циклов, (94°C — 20 с, 55°C — 20 с, 72°C — 5 мин) — 1 цикл.

ПЦР для выявления ДНК микоплазм. Обнаружение микоплазм *hominis*, *laidlawii* и *arginini* в клеточных линиях, проводили, используя готовую тест-систему «ЛТПФ ДНК-технология», в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 5 мкл ДНК, 10 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 ед. Taq-полимеразы, x10 ПЦР-буфер. Программа амплификации: (94°C — 1 мин) — 1 цикл; (94°C — 30 с, 55°C — 25 с, 72°C — 30 с) — 30 циклов.

Электрофорез в агарозном геле. Результаты ПЦР анализировали методом гель-электрофореза, используя трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий в концентрации 0,4—0,5 мкг/мл. Гели анализировали, используя транс-иллюминатор с ультрафиолетовым светом при λ 254 нм. Размер фрагментов ПЦР после анализа составлял 264 п. н. (для BVDV), чувствительность использованного метода — более 10 геном-экв/мкл. В случае анализа микоплазм величина фрагментов ПЦР при использовании пары праймеров GPO3/ MGSO составляла 288 п. н., для праймеров GPO1/ Uni — 472 п. н. и 724 п. н. — для пары праймеров GPO1/MGSO.

Выявление вирусного антигена в клетках, фиксированных холодным ацетоном на стекле, проводили с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с использованием специфических моноклональных антител к Е1 гликопротеину оболочки BVDV и антивидовых аффинно-очищенных IgG-антител, меченных ФИТЦ («Sigma», Германия).

Электронная микроскопия. В некоторых случаях (для оценки корреляции эффективности детекции вируса разными методами) изучали ультратонкие срезы методом электронной микроскопии [5]. Осадок суспензии клеток фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и 1% раствором OsO₄, затем обезживали серией спиртов возрастающей концентрации и пропиленоксидом. Заливку препаратов проводили смесью эпонов по общепринятой методике, окрашивание — уранил-ацетатом. Ультратонкие срезы были получены на ультрамикротоме LKB и исследовались при помощи электронного микроскопа Jeol 100х.

Оценку транскрипции генов цитокинов выполняли путем определения уровня мРНК (ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ ИФН- λ 1, ИФН- λ 2, ИФН- λ 3, ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-17, ФНО α методом ОТ-ПЦР и ПЦРrv по ранее описанной методике [6]. Для определения содержания ИФН- α в культуральной жидкости использовали коммерческий набор тест-систему для определения интерферона альфа методом ИФА («Вектор Бест», Кольцово).

Результаты и обсуждение

В нашем предварительном сообщении [8] была отмечена высокая частота контаминации пестивиром BVDV исследованных перевиваемых клеточных линий (включая отивки разных лет) — до 30%. Были проанализированы клетки разного видового (человек, обезьяны, КРС, овцы, козы, собаки, мыши, крысы,

хомячки) и тканевого происхождения, наиболее часто применяющиеся в вирусологических исследованиях. Суммированные результаты выявления геномной РНК вируса BVDV в исследованных на сегодня клеточных линиях приведены ниже.

Основные виды проанализированных перевиваемых клеточных линий (производных разных биологических видов животных), оказавшиеся контаминированными, отмечены значком*.

Клетки человека: (диплоидные) клетки легкого эмбриона человека — ЛЭЧ, фибробласты легкого эмбриона человека — ФЭЧ, клетки кожно-мышечной ткани — М7; А-549 — карцинома легкого, GL-6 — глиобластома, Т-24 — клетки опухоли мочевого пузыря, НТ29 — карцинома толстой кишки, СаСо* — карцинома кишечника, GM-639 фибробласты большого галактоземией, L₄₁ — клетки костного мозга большого лейкоземией; НЕК* — клетки почек эмбриона человека, НЕК 293т* — клетки почек эмбриона человека, клетки человека HeLa и HeLa-подобные (НЕК, HeLa — карцинома шейки матки, RH — почка эмбриона человека, Нер2 — рак гортани человека, Нuh-7 — клетки гепатомы, Chang conjunctiva — клетки конъюнктивы, Chang liver, Нuh-7* — клетки гепатомы человека, лимфобластоидные клетки человека: Raji — лимфома Беркитта, Namalva*, Daudi, РЗНЗ(R-1)*, РЗНЗ* — все клетки лимфомы, L101* — лейкоциты крови большого лейкозом, Т1387* — Т-лимфоциты костного мозга, Molt-4 — Т-лимфоциты большого лейкоземией).

Клетки обезьян. Было проанализировано 11 клеточных линий.

Клеточные линии почек зеленой мартышки: BGM*, CV1, Vero*, Vero E6*, Vero(B), 4647*, GMK*, BSC1*.

Клетки почек макаки резус: МА-104*, LLC-МК-2*, Frhk-4/R* (8 из 11, т.е. 72%) содержали геномную РНК BVDV.

Клетки крупного рогатого скота. Среди них оказались контаминированными: MDBK* (клетки почки), РТ-80 (клетки почки телят), ПЭК* (клетки почки эмбриона коровы), ТЭБ тестикулы эмбриона быка).

Клетки свиньи: PS, СПЭВ*, ППЭС.

Клетки овцы: FLK*.

Клетки кролика: RK*, RK82.

Клетки собаки: МДСК*.

Клетки кошек: CREK*, СС-81.

Клетки грызунов: мышей и крыс — L₉₂₉, 3Т3 BALB/С* и др., хомячка — ВНК-21*, НАК, ВНК-BS*, СНО-К1* и др.

Всего была проанализирована 131 клеточная линия (маточные культуры и отдельные отвивки), из них клетки человеческого происхождения (более 40 образцов) были контаминированы в 25% случаев (выявлена геномная РНК BVDV — отмечены значком *), клетки обезьян (более 30 проб) — более чем в 60% случаев, клетки домашних животных (более 30) — в 27% случаев. В клетках насекомых вирус обнаружен не был, что, возможно, связано с пониженной температурой культивирования таких клеток (27—28°C). Всего вирус был выявлен в 33% исследованных маточных линий и/или отдельных отвивок. Среди разных закладок клеток приматов геномная РНК BVDV выявлялась чаще всего. Особого внимания заслуживает не только высокая частота контаминации кле-

ток, но и способность вируса инфицировать широкий спектр клеток разной видовой, тканевой и органной специфичности (эпителиальные, фибробластоподобные, мезенхимальные клетки, клетки печени, почек, репродуктивной системы, дыхательного тракта, костного мозга, клетки крови и др.). В определенной степени это коррелирует с разнообразной патологией BVDV-инфекции у основного хозяина — КРС (поражение клеток дыхательного тракта, кроветворной системы, эпителиальных клеток кишечника, репродуктивной системы, поражение эмбриона) и описанными случаями выявления этого вируса у других видов домашних животных [1, 12]. Таким образом, впервые была показана высокая рецепторная пластичность пестивируса BVDV и его способность репродуцироваться в клетках животных, принадлежащих к разным биологическим видам, аналогично представителям рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [12]. Следует обратить внимание на то, что во всех изученных клеточных линиях цитопатический эффект не проявлялся.

Результаты исследования отдельных клеточных линий и ЭТС методом ОТ-ПЦР представлены на рис. 1, а—ж (см. 2-ю полосу обложки) (электрофорез продуктов реакции). На рис. 1а, в, е приведены результаты анализа различных клеточных линий. Было показано, что количество вирионной РНК (геном-эквивалентов) BVDV в разных типах клеток и разных закладках значительно варьирует: от 10² до 10⁸ в пробе (каждая проба — 5·10⁵ клеток). Примечательно, что более ранние маточные закладки клеток (10 лет и более назад) оказались менее контаминированными BVDV. Такая ситуация является отражением чрезвычайно широкого распространения пестивируса BVDV в крупных и мелких животноводческих хозяйствах разных стран, в том числе России, где доминирующим является вирус 1-го генотипа.

Присутствие антигенов BVDV в клетках было доказано методом РНИФ (свечение вирусного гликопротеина в цитоплазме на рис. 2, а—г, см. 3-ю полосу обложки), а его генетического материала — методом ОТ-ПЦР (наличие вирионной РНК в клетках на рис. 1). В некоторых случаях использовали метод электронной микроскопии ультратонких срезов клеток. Вирусные частицы сферической формы диаметром ~60 нм с типичной морфологией пестивирусов были обнаружены внутри цитоплазматических вакуолей (на рис. 3 ЭМ—фотография клеток МДСК). В этой же клеточной культуре получены положительные результаты РНИФ и ОТ-ПЦР.

Известно, что первичным источником заражения клеток BVDV является сыворотка крови инфицированных коров [9, 16, 23], поэтому мы проанализировали 37 образцов разных партий коммерческих ЭТС производства отечественных и зарубежных фирм (разные лоты) коммерческих фирм «Биолот» (КРС), «Фуоро» (КРС), «Панэко» (ЭТС), «Sigma» (ЭТС), «HyClone» (ЭТС), «Amimed» (ЭТС). Вирионная РНК BVDV была выявлена более чем в 60% случаев. По понятным причинам (см. рис. 1, ж) фирмы-производители исследованных сывороток не уточняются. На рис. 1, з, д приведены результаты исследования методом ОТ-ПЦР разных сывороток, разведенных 10⁵—10⁹. В случае выявления РНК BVDV в пробах сывороток ее

уровни колебались от 10^3 до 10^8 геном-экв/мл.

Чтобы определить время, в течение которого клетки оказываются контаминированными BVDV за счет содержащей этот вирус ЭТС, были проведены опыты по культивированию «чистых» клеток Vero в среде Игла—МЕМ с 10% ЭТС с высокими уровнями РНК BVDV (10^5 — 10^7 геном-экв/мл). Культивирование клеток в таких условиях приводило к контаминации клеток вирусом и последующей персистентной инфекции, что можно было обнаружить уже на 3—5-м пассаже (см. рис.1, б, дорожки 1, 2, 3. Дорожка 1 — 3-и сутки культивирования и т.д.). Отмечено, что «скорость» контаминации клеток (выявляемой использованными нами методами) зависела от исходного уровня вируса в использованной сыворотке. Кроме того, видовое происхождение клеток и штаммовые особенности BVDV, исходно присутствовавших в ЭТС и контаминировавших затем клетки, также могли повлиять на эффективность проникновения вируса в клетки [17, 29, 30].

Наоборот, при культивировании контаминированных клеток Vero в среде с ЭТС, не содержащей BVDV, РНК вируса можно было обнаружить в среде культивирования на 3—5-е сутки после очередного пересева (см. рис. 1б, дорожки 4, 5, б). Это можно рассматривать как дополнительное подтверждение полного цикла репродукции BVDV в клетках с его выходом из клетки. Таким образом, было доказано, что источником быстрого заражения клеток является использование сывороток КРС (эмбриональная сыворотка крови, сыворотка новорожденных телят и взрослого поколения), которые были получены от инфицированных животных-доноров.

Микоплазмы в культуре клеток. К настоящему времени основным способом выявления микоплазм в клеточных культурах является метод ПРЦ [11, 15, 21, 22, 25]. Всего нами было исследовано 69 образцов клеточных культур (клеточные отводки маточных линий, разных лет), из них в высоком проценте случаев (>20) был выявлен один из видов микоплазм (отмечены значками * в тесте на общую микоплазму и *M. hominis*, значком** в тесте на общую микоплазму и *M. laidlawii*, значком*** в тесте на общую микоплазму и *M. arginini*). Так, в клетках HeLa (21/04/10)* (карцинома шейки матки) микоплазма была выявлена в одном случае (1/1); в клетках эпителия почки Frhk*** микоплазма была выявлена в двух из четырех протестированных закладок (2/4); в клетках глиобластомы крысы ЭПНТ* — 1/1; в клетках глиобластомы человека GL* — 1/1; в клетках гепатомы человека CH5 (28/10/10)* — 1/3; в клетках гепатомы человека LUNNET* (10/11/08) — 1/3; в клетках нервной ткани хорька Mpf (03/11/06)* — 2/2.

В результате наших исследований показано, что ОТ-ПЦР на общую микоплазму и определение трех специфических видов (*M. hominis*, *M. laidlawii*, *M.*

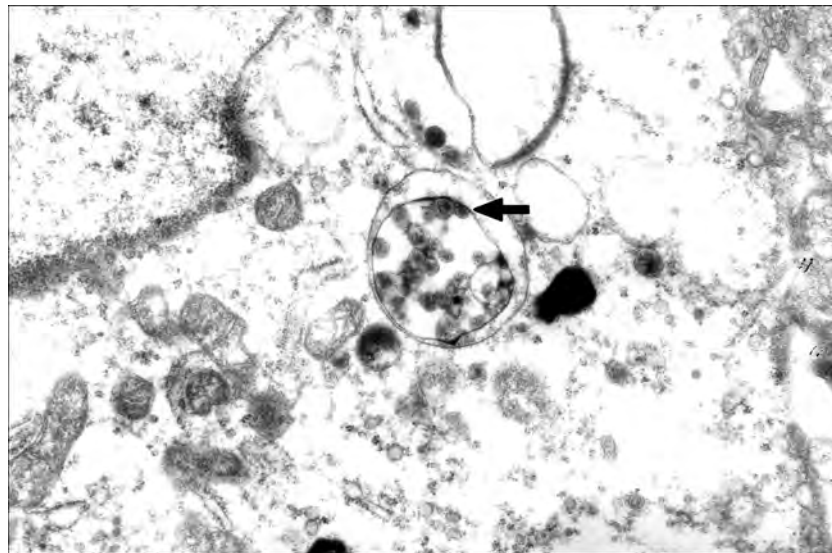


Рис.3. Электронно-микроскопическое изображение ультратонкого среза клетки MDCK. В цитоплазматической вакуоли клетки видны формирующиеся вирионы BVDV (указаны стрелкой).

arginini) достаточно с позиций оценки качества клеток и необходимости их исключения для производственных и научных целей.

Кроме того, использование метода ОТ-ПЦР, основанного на выявлении бактериальной 16S РНК в течение 1—2 сут, оказывается преимущественным по затратам времени (по сравнению с цитохимическим методом окрашивания клеток, 3—4 нед) для массового скрининга клеточных линий, а также превосходит последний по чувствительности более чем в 10 раз [22].

Присутствие микоплазм в перевиваемых клеточных культурах обычно изменяет клеточные реакции на воздействие внешних стимулов, что может привести к ошибочным результатам в эксперименте и неверным выводам. Взаимодействие между вирусными и прокариотическими патогенами пока изучено недостаточно. Модель такого взаимодействия была предложена в работах [19, 28]. Показано также, что разные типы клеточных культур по-разному перmissive для разных типов микоплазм [28].

Полученные нами данные свидетельствуют, что основная часть контаминированных микоплазмой клеточных линий избирательно сохраняла определенную специфичность к разным видам.

Влияет ли персистирующая BVDV-инфекция на показатели функциональной активности клеточного генома? Ранее было показано, что BVDV-инфекция в хронически инфицированных BVDV клетках протекает без наблюдаемых с помощью методов световой микроскопии морфологических изменений. В нашем

Разнонаправленные изменения экспрессии генов цитокинов в процессе культивирования Vero- и контаминированных Vero+

Клетки в течение 72 ч	ИФН-α	ИФН-λ			ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-8	ИЛ 17	ФНОα
		1	2	3					
Vero-	н/и	↓	↑	↑	↑	н/и	н/и	↓	↑
Vero+	↑↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	н/и	н/и

Примечание: ↑ — активация транскрипции цитокинов; ↓ угнетение транскрипции цитокинов, н/и — уровень транскрипции цитокинов не изменяется по отношению к конститутивному уровню.

предыдущем сообщении указывалось, что представители разных семейств вирусов с разной эффективностью репродуцировались в контаминированных клетках: в случае вирусов гриппа А урожай в клетках MDCK (BVDV+) был ниже, чем в «чистой» культуре (наблюдение И. Т. Федякиной, 2011). В клетках Vero при равных условиях заражения вирусом Синдбис урожай вируса по срокам инфекции был практически одинаков, в пределах ошибки титрования, а заражение в одинаковых условиях двух типов клеток вирусом Синдбис сопровождалось развитием цитопатического эффекта (наблюдение К. С. Ионовой, 2011).

В связи с этим представлялось интересным выяснить, влияет ли персистирующая BVDV-инфекция клеток на показатели функциональной активности клеточного генома. Для этого мы сравнили особенности экспрессии генов цитокинов в линиях клеток Vero, нормальных и контаминированных вирусом BVDV (в обоих случаях не содержащих микоплазму), в условиях стационарного культивирования клеток Vero неконтаминированных (Vero «чистых») — Vero- и контаминированных BVDV Vero+ в течение 3 сут.

В нашей работе мы приводим только разнонаправленные реакции клеточных генов в двух типах клеток в ответ на индукцию (см. таблицу).

В клетках, контаминированных BVDV (Vero+), в отличие от нормальных (Vero-) в течение 72 ч культивирования изменялась экспрессия гена ИФН- α , а также активировалась транскрипция ИФН- λ 1, ИЛ-2 и угнеталась транскрипция ИФН- λ 2, ИФН- λ 3, ИЛ-1 β и ИЛ-8. Особого обсуждения заслуживает изменение экспрессии гена ИФН- α на уровне транскрипции в Vero+-клетках, хотя по данным определения титров внеклеточного ИФН- α в культуральной жидкости различия не были выявлены. Что это: реальные различия в продукции ИФН- α на уровне транскрипции гена и трансляции иРНК или эффект разной чувствительности методов определения продуктов транскрипции гена и трансляции иРНК? Этот факт представляет особый интерес, так как известно, что один из белков репродуцирующегося BVDV ингибирует выработку ИФН- α в зараженных клетках. Представленные данные коррелируют с результатами исследований S. R. Lee и соавт. [17], выявившими изменения уровней экспрессии генов toll-like-рецепторов, интерферонов 1 типа, провоспалительных и Th1/Th2 цитокинов в моноцитах периферической крови коров в зависимости от времени после инфекции и фенотипа (ср-BVDV 1 и non-ср-BVDV) вируса. Рассматривая механизмы персистентной BVDV-инфекции, авторы высказали гипотезу об ускользании BVDV от иммунных реакций организма путем изменения экспрессии генов TLR 3 и TLR 7 (семейство генов TLR) и их сигнальных путей.

Полученные нами данные будут более подробно представлены в специальной публикации.

Изложенные результаты подчеркивают необходимость постоянного контроля ЭТС и клеток на присутствие BVDV и контаминации микоплазмами [26], репродуцирующимися в клетках без морфологических проявлений инфекции. Особое внимание нужно обращать на стерильность ЭТС, являющихся основным источником контаминации клеток. Такой контроль должен быть установлен и для проверки «живых»

вакцинных препаратов, в которые вирус может попасть из контаминированных клеток и фетальной сыворотки телят [20, 24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вирусная диарея — болезнь слизистых крупного рогатого скота. В кн.: Самуйленко А. Я. и др. (ред.). Инфекционная патология животных. М.: ИКЦ «Академкнига»; 2006. 142—165.
2. Глотов А. Г., Глотова Т. И., Рябчикова Е. И., Сергеев А. Н. Выделение и характеристика изолятов вируса вирусной диареи — болезни слизистых крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2006; 1: 42—45.
3. Глотов А. Г., Глотова Т. И., Южаков А. Г. и др. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. Вопросы вирусологии. 2009; 5: 43—46.
4. Гришина З. В. Надлежащая практика тканевых и клеточных технологий GTF (Good Tissue Culture). В кн.: Пальцев М. А. (ред.). Биология стволовых клеток и клеточные технологии. 2009; т. 2: 413—437.
5. Гуцина Е. А., Цилинский Я. Я., Усманов Р. К. и др. Изучение морфологических аспектов вируса Охотский в клетках культуры куриных фибробластов. Вопросы вирусологии. 1977; 1: 8—12.
6. Ериов Ф. И., Мезенцева М. В., Васильев А. Н. и др. Методические указания по проведению доклинических исследований цитокин-индуцирующей активности противовирусных препаратов. Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. 2002; 1 (9): 26—29.
7. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. М.; 2007.
8. Урываев Л. В., Дедова А. В., Дедова Л. В. и др. О контаминации клеточных культур вирусом диареи — болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV). Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012; 153 (1): 88—93.
9. Bolin S. R., Ridpath J. F., Black J. et al. Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. J. Virol. Meth. 1994; 48: 211—221.
10. Decaro N., Lucente M. S., Mari V. et al. Atypical pestivirus and severe respiratory diseases in calves, Europe. Emerg. Infect. Dis. 2011; 17 (8): 1549—1552.
11. Drexler H. G., Uphoff C. C., Dirks W. G., VacLeod R. A. Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. Leukocyte Res. 2002; 26: 329—333.
12. Genus Pestivirus. In: Faquet C. M. et al., eds. Virus taxonomy. 8-th report on the International taxonomy of viruses. Elsevier, 2005; 988—992.
13. Hamers C., Couvreur B., Dehan P. et al. Differences in experimental virulence of bovine viral diarrhoea strains isolated from hemorrhagic syndromes. Vet. J. 2000; 160: 250—258.
14. Houe H. Epidemiology of bovine viral diarrhoea virus. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 1995; 11: 521—547.
15. Kazemih A. M., Shokgroser M. A., Arabestani M. R. et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasma infections from various mammalian cell lines: a local experience. Cytotechnology. 2009; 61 (3): 117—124.
16. Kozasa T., Tajima M., Yasutomi I. et al. Relationship of BVDV persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. Vet. Microbiol. 2005; 106 (1—2): 41—47.
17. Lee S. R., Pharr G. T., Boyd B. L., Pinchuk L. M. BVDV viruses modulate toll-like receptors, cytokines and co-stimulatory molecules gene expression in bovine peripheral blood monocytes. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2008; 31 (5): 403—418.
18. Levings R. L., Wessman S. J. Bovine viral diarrhoea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Dev. Biol. Stand. 1991; 75: 177—181.
19. Lidsky P. V., Romanova L. I., Agol V. I. Interaction between viral and prokaryotic pathogens in mixed infection. J. Virol. 2009; 83 (19): 9940—9951.
20. Lindberg A. L. et al. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. Vet. Quart. 2004; 1 (1): 1—16.
21. McGowin C. L., Popov V. L., Pyles R. B. Intracellular Mycoplasma genitalium infection of human. BMC Microbiol. 2009; 9: 139.
22. Peredelchouk M., David S. A., Bhattacharya B. et al. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR analysis. J. Appl. Microbiol. 2011; 110 (1): 54—60.
23. Peterhans E., Bachofen C., Stalder H., Schweizer M. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction. Vet. Res. 2010; 41 (6): 1—13.

24. Studer E., Bertoni G., Candrian U. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccine. *Biologicals*. 2002; 30 (4): 289—296.
25. Sung H., Kang S. H., Bae Y. J. et al. PCR-based detection of Mycoplasma species. *J. Microbiol.* 2006; 44: 42—49.
26. Thornton D. H. A survey of mycoplasma detection in veterinary vaccines. *Vaccine*. 1986; 4: 237—240.
27. Vilcek S., Nettleton P. F. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol.* 2006; 116: 1—12.
28. Volokhov D. V., Kong H., George J. et al. Biological enrichment of mycoplasma agents by cocultivation with permissive cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74 (17): 5383—5391.
29. Xia H., Vijayaraghavan B., Belak S., Liu L. Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *Plos One*. 2011; 6 (12): e28553.
30. Zabal O., Cobraka L., Lager I. A. et al. Contamination of bovine fetal serum with bovine diarrhoea virus. *Rev. Argent. Microbiol.* 2000; 32 (1): 27—32.

Поступила 22.03.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 616.915-078.33

Особенности лабораторной диагностики кори у больных с разным прививочным анамнезом

Т. А. Мамаева¹, Г. Ю. Липская², М. А. Наумова¹, С. В. Шульга¹, М. Mulders³, D. A. Featherstone⁴, Л. А. Завьялова⁵, Е. В. Чернышова⁶, Е. П. Замятина⁷, Н. Н. Кузнецова⁷

¹ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва; региональная референс лаборатория ЕРБ ВОЗ; ²НИИФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова; ³ЕРБ ВОЗ, Копенгаген, Дания; ⁴ВОЗ, Женева, Швейцария; ⁵ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области, Благовещенск; ⁶ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области, Новосибирск; ⁷ФГУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае, Красноярск

Методом ИФА были исследованы 119 сывороток, полученных на 5—6-й день после появления сыпи от больных корью (в возрасте 4 мес—48 лет) с разным вакцинальным анамнезом. Результаты показали, что встреча с вирусом кори у 59 пациентов была первичной, у 60 больных отмечен вторичный иммунный ответ со значительным увеличением специфических высокоавидных IgG ($22,34 \pm 3,2$ МЕ/мл). Установлено, что тесты capture-формата позволяют выявлять IgM в 100% случаев, независимо от прививочного анамнеза больного. Положительный (100%) результат в тесте indirect-формата был получен только при исследовании сывороток непривитых больных, тогда как при вторичном иммунном ответе IgM были определены в 23,3% случаев. Клинические различия были выявлены у непривитых и привитых взрослых лиц. Обсуждается роль больных с вторичным иммунным ответом в трансмиссии вируса.

Ключевые слова: корь, ИФА, первичный и вторичный иммунный ответ, IgM, IgG, авидность IgG

Peculiarity of the Laboratory Diagnostic of the Measles Virus Infection in Previously Vaccinated and Unvaccinated Patients

T. A. Mamaeva¹, G. Y. Lipskaya², M. A. Naumova¹, S. V. Shulga¹, M. Mulders³, D. A. Featherstone⁴, L. A. Zavyalova⁵, E. V. Chernyshova⁶, E. P. Zamyatina⁷, and N. N. Kuznetsova⁷

¹ Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, WHO European Reference Laboratory for Measles and Rubella, Moscow, Russia; ² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ³ WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark; ⁴ WHO, Geneva, Switzerland; ⁵ Center for Hygiene and Epidemiology in Amur Oblast, Blagoveshensk, Russia; ⁶ Center of Hygiene and Epidemiology in Novosibirsk Oblast, Novosibirsk, Russia; ⁷ Center for Hygiene and Epidemiology in Krasnoyarsk Region, Krasnoyarsk, Russia

119 specimens of blood sera collected from measles cases with different vaccination history (aged 4 months to 48 years) on 5th-6th days after rash onset were investigated using EIA. The obtained results showed that the primary immune response (PIR) was developed in 59 patients; the secondary immune response (SIR) was developed in 60 patients with a significant increase in the specific high avidity IgG (22.34 IU/ml \pm 3.2). The specific IgM were detected in 100% cases studied with capture ELISA in both previously vaccinated and unvaccinated individuals of different age.

The specific IgM were detected by indirect ELISA in 100% cases in unvaccinated patients, while IgM positive sera was defined only in 23.3% of individuals with SIR. It was concluded that measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated adults had clinical differences. The role of patients with SIR in virus transmission was discussed.

Key words: measles, ELISA, the primary and secondary immune response, IgM IgG, avidity IgG

Складывающаяся в последнее время в мире эпидемическую ситуацию по кори однозначно оценить нельзя. С одной стороны, благодаря широкому применению коревых вакцин наблюдается снижение за-

болеваемости корью, с другой — продолжающиеся вспышки являются одной из актуальных проблем борьбы с коревой инфекцией в рамках программы ВОЗ по элиминации кори к 2015 г. В эпидемиче-

Контактная информация:

Мамаева Тамара Алексеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: mamaeva50@mail.ru

К статье А. Д. Забережного с соавторами.

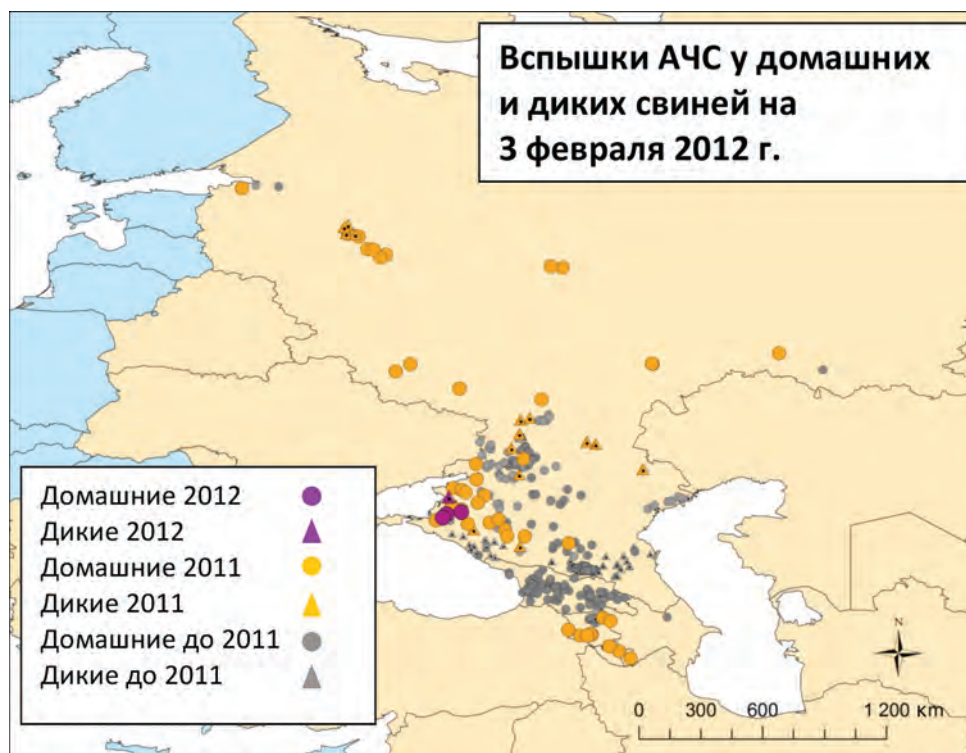


Рис. 3. Вспышки АЧС у домашних и диких свиней на 3 февраля 2012 г.

К статье Л. В. Урываева с соавторами.

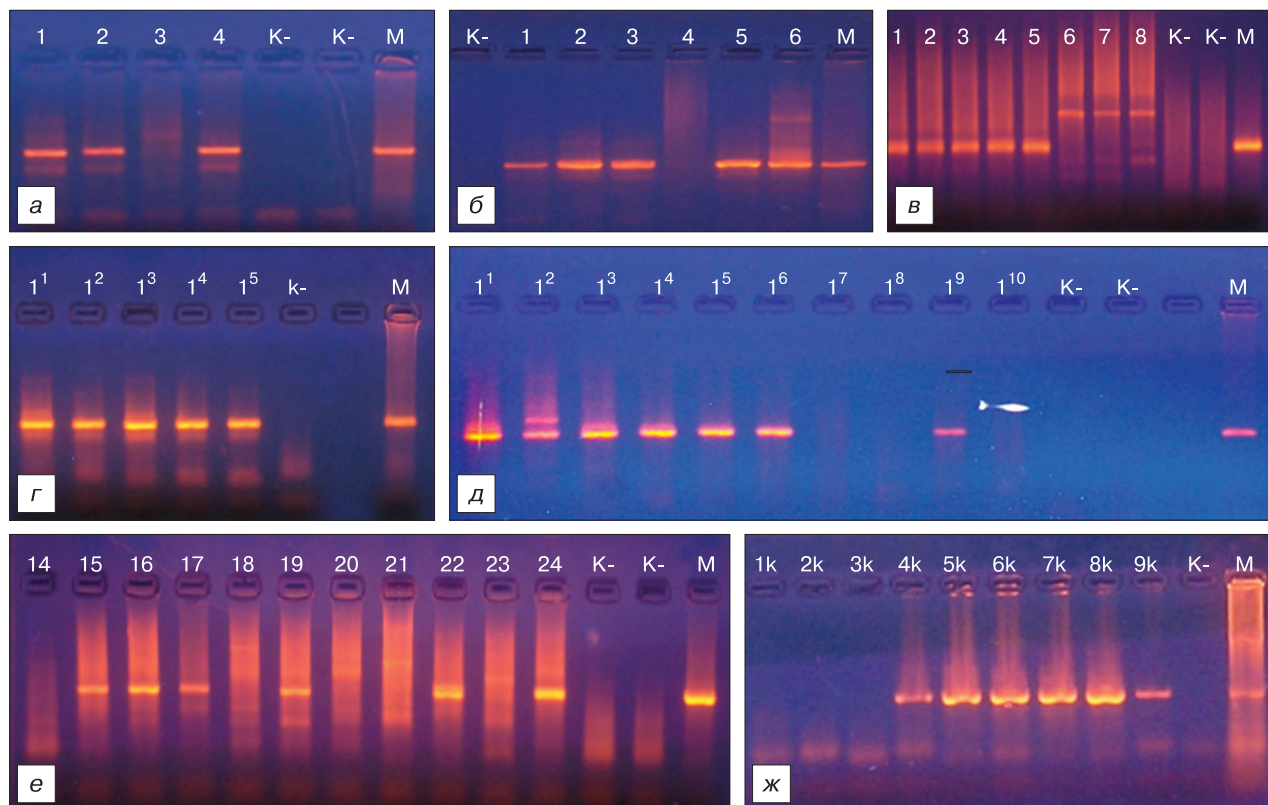


Рис. 1. Результаты исследования отдельных клеточных линий и ЭТС методом ОТ-ПЦР.

a, в, е — результаты анализа различных клеточных линий: *a* — клеточные линии человека: СаСо* (дорожка 1), Huh 7* (дорожка 2), А-549 (дорожка 3), НЕК* (дорожка 4), К — отрицательный контроль, М — маркер; *в* — клетки обезьян (дорожки 1—8): BGM*, BSC1*, GMK*, Frhk-4/R*, Vero E6*, Vero, CV1, Vero(B); *е* — RT-80 (дорожка 14), СПЭВ* (15), MDCK* (16), CREK* (17), HAK (18), FLK* (19), CC-81 (20), MDCK (21), CHO-K1* (22), PS (23), BALB/C* (24); *б* — дорожки 1, 2, 3 — последовательное культивирование клеток в присутствии 10% контаминированной ЭТС; дорожки 4, 5, 6 — выявление РНК BVDV в среде культивирования на 3-и сутки после очередного пересева контаминированных клеток; *г, д* — ОТ-ПЦР сывороток, разведенных 10^5 и 10^8 ; *ж* — анализ коммерческих сывороток.

К статье Л. В. Урываева с соавторами.

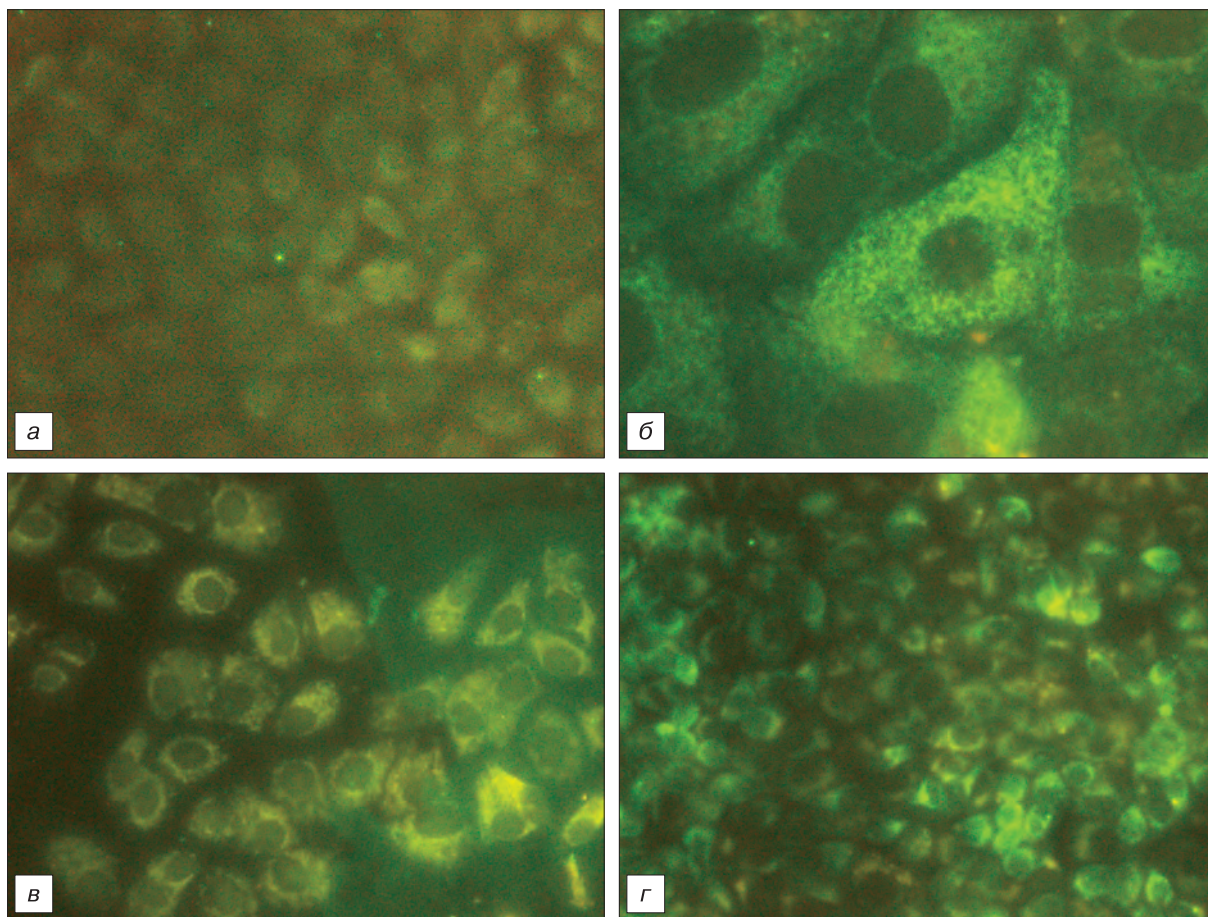


Рис.2. Реакция непрямо́й иммунофлюоресценции — свечение вирусного гликопротеина в цитоплазме различных линий клеток. *а* — неконтаминированные клетки MDCK (контроль). х 40; *б* — клетки Vero E6*. х 100; *в* — клетки CaCo*. х 40; *г* — клетки BALB/C*. х 40.

К статье Р. Я. Подчерняевой с соавторами.

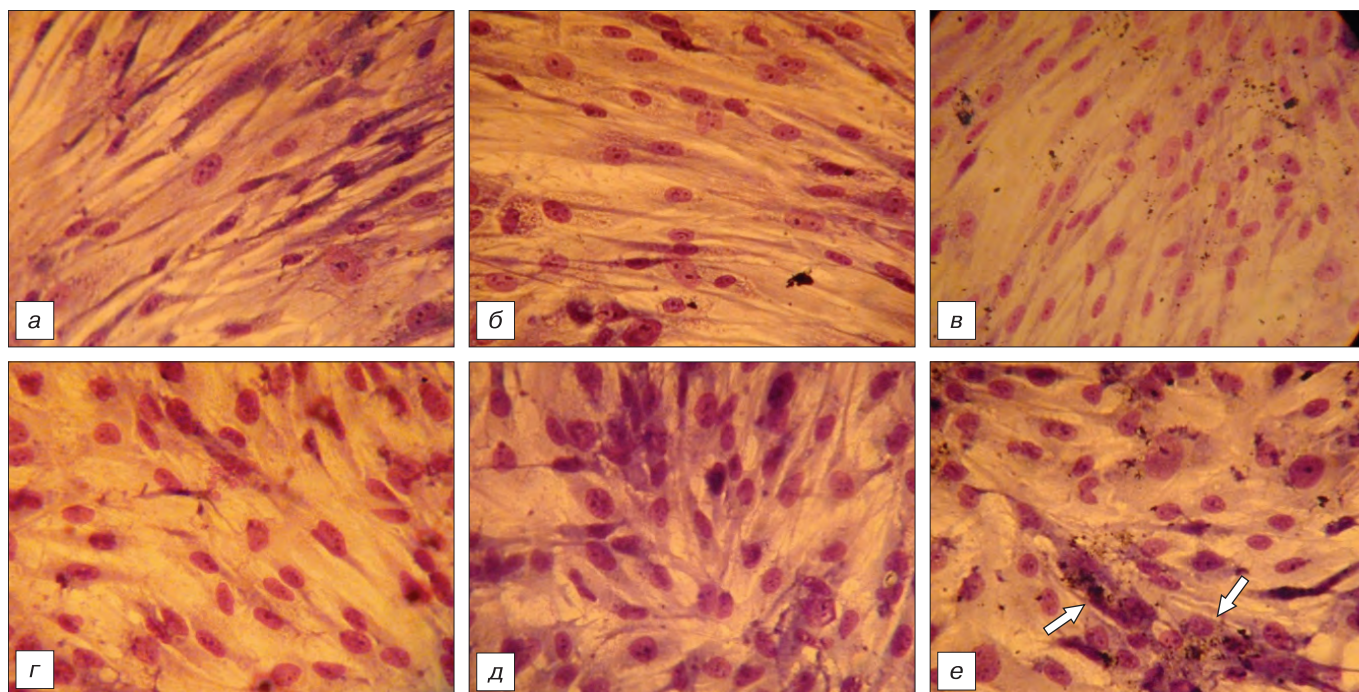


Рис. 1. Фотография клеток ФЭЧ (*а, б, в*) и GL6 (*г, д, е*): контрольных (*а, г*); культивированных на ОСНТ (*б, д*) и МСНТ (*в, е*). Стрелки указывают на скопления нанотрубок. Ув. 400.