

© Бобир В.В., Понятовський В.А., Настенко В.Б.

УДК: 578.835.1:57.017.4:57.083.1

Бобир В.В., Понятовський В.А., Настенко В.Б.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра мікробіології, вірусології та імунології (пр. Перемоги, 34, м. Київ, 03057, Україна)

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДИНАМІКИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙНОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ШТАМІВ ТА КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСІВ КОКСАКІ В

Резюме. Метою роботи було порівняльне вивчення динаміки збереження інфекційності клінічних ізолятів і прототипних штамів вірусів Коксаки В у лабораторних умовах. У дослідженнях використовувалися музейні прототипні штами і клінічні ізоляти вірусів Коксаки В3 та Коксаки В6. Результати експериментів свідчать про досить високу стійкість досліджуваних вірусних популяцій при +4°С. При зростанні температури зберігання зафіксовано зниження резистентності ентеровірусів. Результати досліджень свідчили про зниження резистентності клінічних ізолятів вірусів Коксаки В після їх тривалого культивування в культурах клітин.

Ключові слова: ентеровіруси, інфекційність, культури клітин, резистентність.

Вступ

При оцінці епідемічної небезпеки поширеності вірусних інфекцій великого значення набуває питання довготривалості виживання ентеровірусів. Дані літератури свідчать, що ентеровірусам притаманна значна стійкість до дії несприятливих фізичних та хімічних факторів, це дає їм можливість довгий час виживати в різноманітних об'єктах зовнішнього середовища. Це питання особливо актуальне у зв'язку з тим, що віруси, завдяки своїм біологічним особливостям (внутрішньоклітинні паразити), не розмножуються у зовнішньому середовищі, а тільки перебувають у ньому. Крім того, відомо, що вірулентні та атенуйовані штами вірусів поліомієліту відрізняються між собою за резистентністю при 40°С [1]. В нашій роботі основним завданням було з'ясування питання виживаності клінічних ізолятів та музейних прототипних штамів ентеровірусів у лабораторних умовах за різних температур.

Мета роботи - порівняльне вивчення динаміки збереження інфекційності клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксаки В у лабораторних умовах.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували музейні прототипні штами вірусів Коксаки В3 (штам Nancy) та Коксаки В6 (штам Hammon), одержані з Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН та клінічні ізоляти вірусів Коксаки В3 та Коксаки В6, виділені від осіб з вираженими дисбіотичними порушеннями товстого кишківника.

Для культивування вірусів використано перещеплювані культури клітин: HEp-2 (Circinnati). Усі роботи з культурами клітин проводились у відповідності з методичними рекомендаціями ВООЗ [2]. Видову належність виділених інфекційних агентів визначали у реакції віруснейтралізації, методика постановки якої принципово не відрізнялась від загальноприйнятої [2]. В роботі були використані моно- та полівалентні сироватки виробництва Інституту поліомієліту і вірусних

енцефалітів імені М.П. Чумакова РАМН.

Наявність ентеровірусів у клінічному матеріалі також підтверджували молекулярно-генетичними методами, а саме, постановкою полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). РНК вірусів виділяли шляхом її сорбції на частинках силікагелю за K.Boom [3]. Ампліфікацію вірусної кДНК проводили на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням "GeneAmp PCR System 2400" (США) у відповідності до інструкції виробника. В реакції використовували реагенти тест-системи "Enterovirus-EPh" (Ампли Сенс®, РФ). Наявність та якість ПЛР-продуктів аналізували методом гель-електрофорезу, який проводили у 1,5% агарозному гелі в однократному трис-ацетатному буфері рН 8,5 (0,04 М трис-ацетат та 0,002 М ЕДТА), що містив 0,5 мкг/мл етидия броміду.

Отримані кількісні результати досліджень оброблені загальноприйнятими методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням значень середньої арифметичної (\bar{M}), середньої похибки середньої арифметичної (m). Застосовували ПК з використанням пакету програм фірми Microsoft.

Матеріал витримували при температурі +4°С, +20°С, +37°С та відбирали на 3, 10, 18, 36, 60 та 90 добу від початку експерименту і проводили титрування мікрометодом за цитопатичною дією.

Результати. Обговорення

Результати експериментів, представлені в таблицях 1-3, свідчать про достатньо високу стійкість при +4°С усіх досліджуваних вірусних популяцій. Їх титр мало змінювався протягом 90 днів спостереження. Титр лабораторних штамів вірусів Коксаки В3 та В6 на 90 добу спостереження складав 1,0 Ig10, натомість титр клінічних ізолятів Коксаки В3 та Коксаки В6 становив 1,5 Ig10 та 1,75 Ig10 відповідно.

Резистентність ентеровірусів в цілому знижувалась при зростанні температури зберігання. Так, при 20°С більшість досліджуваних зразків інактивувались вже

Таблиця 1. Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 4°C.

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	4,5±0,18	4,5±0,18	4,0±0,19	3,5±0,19	2,5±0,13	1,5±0,17
	Коксакі В6	4,5±0,18	4,25±0,20	4,0±0,19	3,5±0,20	2,75±0,15	1,75±0,13
II	Коксакі В3	4,5±0,18	4,25±0,20	4,25±0,20	3,0±0,20	2,25±0,16	1,0±0,1
	Коксакі В6	4,5±0,18	4,0±0,20	4,0±0,19	3,25±0,18	2,0±0,15	1,0±0,12

Примітки: I - клінічні ізоляти; II - музейні прототипні штами

Таблиця 2. Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 20°C.

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	3,25±0,18	2,25±0,15	1,75±0,16	1,25±0,11	1,0±0,12	-
	Коксакі В6	3,5±0,19	2,5±0,16	1,75±0,14	1,25±0,16	1,0±0,13	-
II	Коксакі В3	3,0±0,17	2,0±0,18	1,5±0,20	0,5±0,14	-	-
	Коксакі В6	3,0±0,18	1,75±0,12	1,0±0,11	-	-	-

Примітки: I - клінічні ізоляти; II - музейні прототипні штами.

Таблиця 3. Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 37°C.

Віруси		Доба					
		3	10	18	36	60	90
I	Коксакі В3	3,0±0,16	2,25±0,16	1,25±0,12	-	-	-
	Коксакі В6	3,25±0,18	2,0±0,16	1,0±0,11	-	-	-
II	Коксакі В3	3,0±0,14	2,0±0,14	1,0±0,12	-	-	-
	Коксакі В6	3,0±0,12	2,0±0,12	0,75±0,12	-	-	-

Примітки: I - клінічні ізоляти; II - музейні прототипні штами.

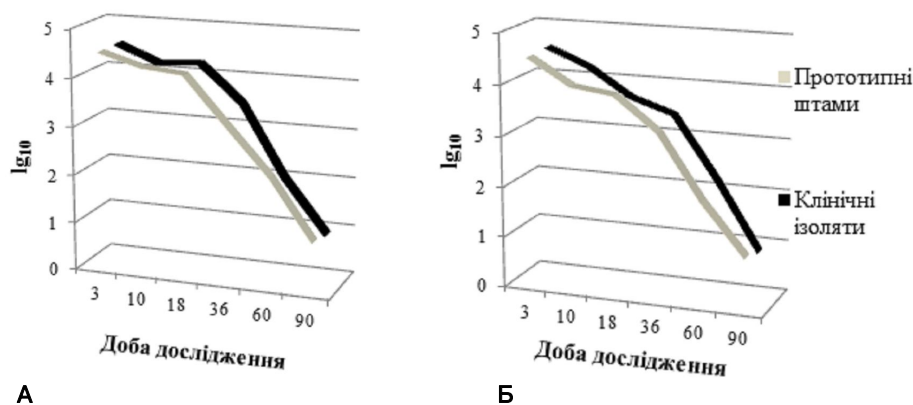


Рис. 1. Вживаність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В після пасажування у культурі клітин +4°C: А - Коксакі В3, Б - Коксакі В6.

на 60 добу спостереження, хоча, слід відмітити, що клінічні ізоляти проявляли дещо вищу стійкість за даних умов зберігання: нами зафіксовано збереження інфекційності вірусів Коксакі В3 та В6 на 60 добу спостереження у титрів 1,0 Ig10. При температурі 37°C динаміка інактивації клінічних та прототипних штамів

вірусів Коксакі В3 та Коксакі В6 відбувалась практично однаково: вже на 36 добу зберігання у дослідних зразках інфекційних вірусних агентів зафіксовано не було.

В цілому слід відмітити вищу резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В у порівнянні з музейними прототипними штамми даних мікроорганізмів.

Крім того, в контексті порівняльних досліджень біологічних властивостей ізолятів ентеровірусів вивчали вплив тривалості пасажування у культурах клітин на їх резистентність при зберіганні за температури +4°C. Для роботи брали віруси, які пройшли по шість пасажів на культурі клітин НЕР-2.

Результати досліджень свідчать про зниження резистентності клінічних ізолятів вірусів Коксакі В після тривалого культивування у культурах клітин. На діаграмі показано, що резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, які пройшли 6 пасажів на культурі клітин не відрізняється від резистентності лабораторних штамів даних мікроорганізмів (рис. 1).

При використанні електронно-мікроскопічних методів було проведено порівняльний структурно-морфологічний аналіз досліджуваних клінічних ізолятів та музейних прототипних штамів вірусів Коксакі В. Експерименти дали змогу з'ясувати, що виділені мікроорганізми відповідають морфології ентеровірусів, мають розміри близько 30 нм, кубічний тип симетрії: є простими вірусам

ми (рис. 2). Разом із тим, було встановлено, що морфологічно вони не відрізняються від лабораторних штамів (рис. 2), в якості прототипних музейних вірусів було використано вірус Коксакі В3, який тривалий час культивувався в лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології НМУ імені О.О.Богомольця.

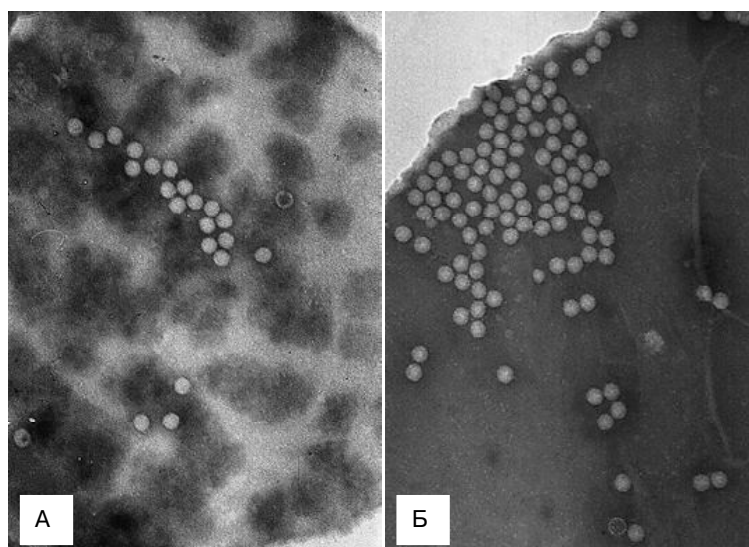


Рис. 2. Електронна мікроскопія. $\times 60000$. А - клінічні ізоляти Коксакі В3; Б - Музейні прототипні штами Коксакі В3.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Порівняльно досліджено динаміку збереження інфекційності клінічних ізолятів та прототипних лабораторних штамів вірусів Коксакі В за різних темпера-

турних режимів.

2. Зафіксовано вищу резистентність у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В у порівнянні з лабораторними штамми при зберіганні за температури $+4^{\circ}\text{C}$ та $+20^{\circ}\text{C}$.

3. Зафіксовано зниження стійкості клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при зростанні частоти пасажів у культурах клітин. Показано, що резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В, які пройшли по шість пасажів на культурі клітин не відрізняється від таких властивостей у прототипних штамів вірусів.

4. Проведений порівняльний електронно-мікроскопічний аналіз структурно-морфологічних властивостей клінічних ізолятів та прототипних лабораторних штамів вірусів Коксакі В свідчить про їх абсолютну ідентичність.

Одержані дані науково обґрунтовують доцільність подальших досліджень властивостей вірусів Коксакі В за різних умов культивування, для поповнення наукових уявлень щодо інфекційності клінічних ізолятів та підвищення ефективності діагностики, лікування, профілактики ентеровірусних інфекцій.

Список літератури

1. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека: Монография / Ворошилова М.К.- М.: Медицина, 1979.- 358с.
2. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е изд. - ВОЗ. - Женева, 2005. - С.3-8.
3. Boom K. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids /K.Boom / J. of clinical microbiology.- 1990.- Vol.1- P.495-503.

Бобир В.В., Понятовський В.А., Настенко В.Б.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ СОХРАНЕНИЯ ИНФЕКЦИОННОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ ШТАММОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСОВ КОКСАКИ В

Резюме. Целью работы было сравнительное изучение динамики сохранения инфекционности клинических изолятов и прототипных штаммов вирусов Коксаки В в лабораторных условиях. В исследованиях использовали музейные штаммы прототипные штаммы и клинические изоляты вирусов Коксаки В3 и Коксаки В6. Результаты экспериментов свидетельствуют об очень высокой устойчивости исследуемых вирусных популяций при $+4^{\circ}\text{C}$. При повышении температуры сохранения зафиксировано снижение резистентности энтеровирусов. Результаты исследований свидетельствуют о снижении резистентности клинических изолятов вирусов Коксаки В после их длительного культивирования в культурах клеток.

Ключевые слова: энтеровирусы, инфекционность, культуры клеток, резистентность.

Boby V. V., Poniatowsky V. A., Nastenko V. B.

A COMPARATIVE STUDY OF THE DYNAMICS OF LABORATORY STRAINS INFECTIVITY AND COXSACKIE B VIRAL CLINICAL ISOLATES

Summary. The aim of this study was to comparative the analysis of conservation of infectivity Coxsackie B clinical isolates and laboratory strains *in vitro*. There were used museum prototypic strains and clinical isolates of virus Coxsackie B and Coxsackie B6 in the research. The experimental results indicate about high stability comparatively of studied viral populations at 4°C . At temperature increase the sharp decline of enteroviruses resistance was registered. The results of the research proved resistance decrease in clinical isolates of Coxsackie B viruses after prolonged cultivation in cell culture.

Keywords: enteroviruses, infectivity, cell cultures, resistance.

Рецензент - д.мед.н., проф.Палій Г.К.

Стаття надійшла до редакції 19.05.2016р.

Бобир Віталій Васильович - к. мед. н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця; vitalibobyv@ukr.net

Понятовський Вадим Анатолійович - асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України; vitalibobyv@ukr.net

Настенко Володимир Борисович - асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця МОЗ України; vitalibobyv@ukr.net