

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-178

ДЛИТЕЛЬНАЯ ПЕРСИСТЕНЦИЯ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO**LONG-TERM PERSISTENCE OF HANTAVIRUS PUUMALA IN VERO CELL CULTURE**

А. Н. Ветрова, С. С. Курашова, М. С. Егорова, Т. К. Дзагурова

*Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва*

A. N. Vetrova, S. S. Kurashova, M. S. Egorova, T. K. Dzagurova

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*

✉ ann.vetr.99@mail.ru

Аннотация

Для хантавируса Пуумала, возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом, представляет интерес изучение персистенции вируса в клеточной культуре. В природе хантавирусы характеризуются хронической инфекцией основного хозяина, не влияющей на его жизнедеятельность. Мы исследовали хроническую инфекцию хантавируса Пуумала в культуре клеток Vero.

Abstract

For hantavirus Puumala, which is the causative agent of hemorrhagic fever with renal syndrome, it is of interest to study the virus persistence in cell culture. In nature, hantaviruses are characterized by a chronic infection of the main host that does not affect its vital activity. We investigated chronic infection of hantavirus Puumala in Vero cell culture.

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая возбудителями из рода *Orthohantavirus*, занимает ведущее место среди природно-очаговых инфекций на территории РФ. Основную этиологическую роль в структуре заболеваемости ГЛПС в России занимает вирус Пуумала, вызывающий до 97 % случаев заболеваний.

Несмотря на распространенность заболевания, многие аспекты взаимодействия «вирус — хозяин», способствующие длительной и бессимптомной персистенции вируса в его естественных хозяевах (*Rodentia*), но при этом вызывающие тяжело протекающее заболевание у человека, остаются малоизученными. Известно, что хантавирус Пуумала, адаптированный к клеточной культуре Vero, не вызывает цитотоксического эффекта. Цель исследования — определение продолжительности персистенции вируса Пуумала в культуре клеток Vero при различных условиях культивирования.

Материалы и методы

Культивирование вируса Пуумала штамм PUU-TKD-VERO проводили в культуре клеток Vero. В эксперименте оценивали три варианта ведения зараженной вирусом Пуумала культуры клеток: 1 — без смены среды и пассирования (доживание); 2 — с регулярной сменой среды, но без пассирования; 3 — с пассированием каждую неделю. На каждый вариант использовали по 2 культуральных флакона площадью 25 см², с множественностью заражения — 0,02.

В качестве контроля использовали аналогичные варианты ведения чистой культуры, культивирование которых осуществлялось так же, как и зараженных. Культивирование флаконов с культурой Vero велось в СО₂-инкубаторе при t = 37 °C со сменой среды (9 мл) каждые 5–7 дней во флаконах группы 2 и с пассированием каждые 7 дней флаконов группы 3. Из флаконов регулярно отбирались пробы: культуральной жидкости из флаконов групп 1 и 2 и клеточной взвеси из флаконов группы 3. В собранных пробах количественное содержание вируса Пуумала оценивалось по титру вируса методом определения числа фокусобразующих единиц (ФОЕ/мл) в культуре клеток Vero, а также при помощи метода флуоресцирующих антител. Количество вирусной РНК определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

Результаты

Во флаконах групп 1 и 2 титр вируса достигал максимальных значений в $4,0-4,5 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл к 7-м суткам, после чего титр снижался до порога чувствительности метода ($1-2 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл) к 20–23-м суткам. Количество вирусной РНК в пробах коррелировало с динамикой титра вируса. Клеточный монослой в зараженных флаконах морфологически не отличался от монослоя в контрольных флаконах для всех вариантов культивирования. Дегенерация клеточного монослоя как зараженной, так и чистой культуры наблюдалась в одни сроки: 22–23 дня для группы 1; 81–84 дня для группы 2. Заражение вирусом Пуумала не оказало никакого негативного влияния на выживаемость культуры клеток Vero.

Флаконы группы 3 были пассированы более 20 раз (исследование продолжается) без добавления незараженной культуры Vero. Титр вируса в пробах после пассажей 1–3 составлял $5,5-6,0 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл, после пассажей 4–6 — $3-4 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл, далее он находился в промежутке $0-2 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл. Количество вирусной РНК в пробах из флаконов группы 3 было в целом значительно выше, чем в пробах двух других групп, что объясняется содержанием в них зараженных клеток, из которых при пробоподготовке к ПЦР также выделяется РНК. Количество копий было максимальным на втором и третьем пассажах ($1,56 \cdot 10^7$ и $1,93 \cdot 10^7$ копий РНК/мл), после чего снижалось до показателей $2 \times 10^5-4 \times 10^5$ копий РНК/мл. Наблюдалась волнообразная динамика с возрастанием количества РНК на пассажах 9, 14, 16, и 18, которое также сопровождалось возрастанием и титра вируса в пробах (до $3-3,5 \pm 0,3 \lg$ ФОЕ/мл).

Заключение

Многочисленное пассирование культуры клеток Vero, зараженной вирусом Пуумала, без добавления незараженных клеток позволило нам установить наличие длительной персистенции вируса за счет цикличности его репродукции (пиковые значения сменяются депрессией).

Прямая зависимость содержания вируса и количества копий вирусной РНК в культуральной жидкости и клетках объясняется достаточной ресурсной базой клеток на ранних этапах инфекции. В дальнейшем при постепенном истощении ресурсов клеток отмечается нарастание вирусной РНК, но созревание вируса не происходит: по-видимому, предпочтение отдается синтезу клеточных белков. Таким образом, для поддержания персистирующей инфекции тормозится созревание вируса, что сохраняет жизнедеятельность «хозяина», в данном случае — клеточной культуры.