

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ТРАНСФОРМАЦИЙ КЛЕТОЧНОГО МОНОСЛОЯ VERO-V В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ РЕПРОДУКЦИИ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ

Д.В. Роменская, Т.Б. Манин, Б.Л. Манин

Федеральный центр охраны здоровья животных, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир,

romenskaya@arriach.ru

Представлены результаты взаимодействия метапневмовируса птиц с клетками перевиваемой культуры почки африканской зеленой мартышки Vero-V на разных сроках культивирования. Проведена корреляция между степенью поражения клеток и монослоя с количеством вирусного агента, выявленного титрованием.

Ключевые слова: репродукция вируса, метапневмовирус птиц, Vero-V, синцитий, симпласт.

Взаимодействие вируса и клетки остается актуальной проблемой, изучением которой заняты исследователи самых различных специальностей.

Репродукция вирусов животных и птиц на чувствительных клеточных линиях является основой получения антигенов для производства вакцин. Исследование взаимодействия вирусов и клеток позволяет изучить этапы и динамику этого процесса, а также получить информацию о вероятных изменениях, происходящих в тканях и клетках при патологических процессах *in vivo*.

Метапневмовирусная инфекция (МПВИ) – высококонтагиозное вирусное заболевание индеек, кур и других видов домашней и дикой птицы; характеризуется воспалительными процессами верхних дыхательных путей и инфраорбитальных синусов, сопровождается затрудненным дыханием, чиханием, хрипами и назальными выделениями. Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус рода *Metapneumovirus*, семейства *Paramyxoviridae* (1, 2, 3, 4). Применение вакцин, полученных на основе культурального вируса, создаёт полноценный иммунитет от заболевания метапневмовирусной инфекцией птиц (5, 6). В доступной литературе практически нет сведений о цитоморфологических изменениях в клетках и тканях при поражении метапневмовирусом *in vivo*.

Целью наших исследований было изучить цитоморфологические трансформации клеток и клеточного монослоя постоянной линии Vero-V и определить время максимального накопления вируса.

Материал и методы

Вирусный материал. Мы использовали изолят метапневмовируса птиц подтипа В.

Культура клеток. Культивирование метапневмовируса птиц и определение его инфекционной активности проводили в перевиваемой культуре клеток почки африканской зеленой мартышки Vero-V. Температура инкубации нормальной и зараженной клеточной культуры равнялась 37,5-38°C. Клетки Vero-V, выращенные на покровных стеклах в пенициллиновых флаконах, окрашивали 0,001%-ным раствором флуоресцирующего красителя акридинового оранжевого в течение 2 минут, после чего анализировали под люминесцентным микроскопом МЛ-26. Неокрашенные клетки исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии на микроскопе Olympus CKX-4.

Питательные среды и растворы. В качестве ростовой среды для линии клеток Vero-V использовали питательную среду синтетическую ПСС (аналог распространенной среды DMEM) с добавлением 10% сыворотки крови КРС, pH среды 7,0 -7,2.

В качестве поддерживающей среды для вируса использовали питательную среду ПСС с 2% инаktivированной при 56°C в течение 30 мин сывороткой крови КРС, pH среды 7,3-7,5. Монослой клеток Vero-V отмывали солевым раствором Хенкса - pH 7,1 – 7,2. Коррекцию величины pH среды проводили 7,5% раствором бикарбоната натрия.

Для предотвращения бактериального пророста сред и раствора Хенкса добавляли антибиотики в общепринятой концентрации.

Культуральные сосуды и аппараты. Лабораторное культивирование метапневмовируса птиц проводили во флаконах емкостью 50 см³ фирмы «Costar», а также в роллерных сосудах емкостью 3,0 дм³ и полезной площадью 620 см². Материал во флаконах культивировали стационарно, а для выращивания в сосудах использовали роллерную установку промышленного типа с барабанами на 12 сосудов и скоростью вращения 8-12 об/час.

Определение инфекционной активности. Инфекционную активность метапневмовируса птиц определяли титрованием в 48-часовой культуре клеток Vero-V. Вирус титровали в десятикратном разведении от 10⁻¹ до 10⁻⁹. Чтобы получить последовательное 10-кратное разведение, брали по 1,0 см³ вирусной суспензии и последовательно вносили в пенициллиновые флаконы, содержащие по 9,0 см³ питательной среды. Материалом каждого разведения заражали по 4 флакона с культурой клеток путем внесения в поддерживающую среду по 1,0 см³ соответствующего разведения суспензии инфицированных клеток в поддерживающей среде. В качестве контроля при титровании оставляли 4 флакона с

незараженной культурой клеток. Учет цитопатического действия вируса (ЦПД) проводили через каждые 24 часа. Титр вируса выражали в $\lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ и рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Результаты и обсуждение

Нами были изучены стадии взаимодействия штамма метапневмовируса подтипа В с клетками Vero-V в процессе получения культурального антигена для производства вакцины против данной инфекции. Цитопатическое действие вируса изучалось с помощью фазово-контрастной микроскопии и цитохимического метода (окрашивание нативных препаратов флуоресцирующим красителем акридиновым оранжевым и дальнейшее их изучение с помощью люминесцентной микроскопии).

Интakтный монослой культуры клеток Vero-V представлен эпителиоподобными клетками. В сформированном монослое мембраны клеток плотно прилегают, образуя псевдосинцитий (рис.1). Акридиновый оранжевый окрашивает ядра клеток в зелёный цвет, а ядрышки и цитоплазму – в различные оттенки оранжевого.

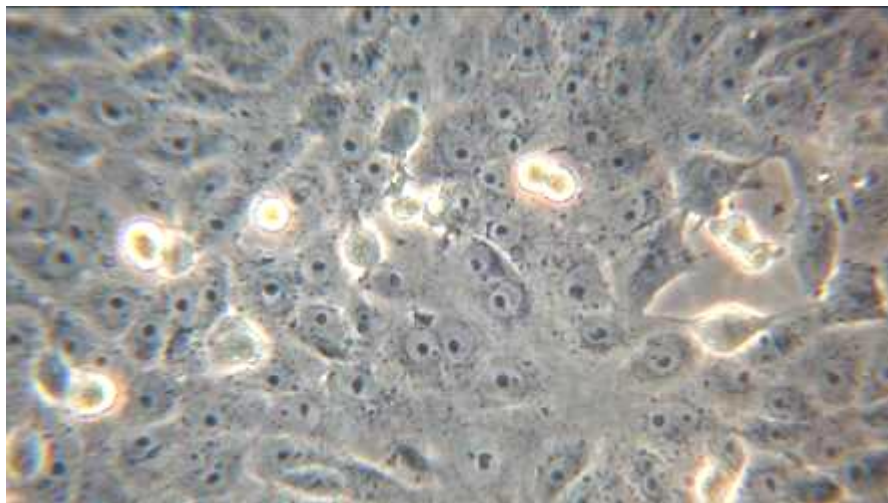


Рис.1. Интактная культура клеток Vero–V (фазово-контрастная микроскопия).

Патологические изменения в клетках Vero-V наблюдаются через 20-24 часа после заражения вирусом. Основным морфологическим признаком репродукции вирусов служит образование многоядерных клеток. Через 36 часов культивирования начинают формироваться симпласты, в которых может находиться до 50 и более ядер. При нормальной репродукции вируса симпласты формируются на 70% площади монослоя (рис.2). По

морфологическим признакам симпласты на этой стадии имеют неразрушенную наружную мембрану.

В поле зрения люминесцентного микроскопа внутри симпласта в цитоплазме наблюдается усиление оранжевого свечения, что является признаком накопления РНК. Ядра клеток также имеют неразрушенную оболочку, чёткую структуру; в то же время усиливается оранжевое свечение ядрышек.

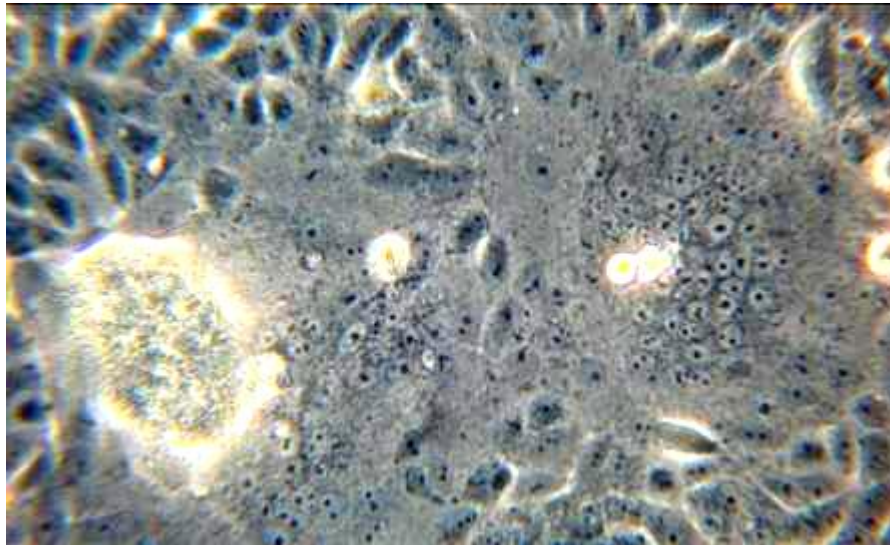


Рис. 2. Формирование симпластов в культуре клеток Vero-V (48 часов, фазовый контраст).

На третьи сутки культивирования в симпластах формируются однородные сферические структуры, которые хорошо видны в фазовом контрасте (рис.3). По морфологии они аналогичны ядрам, но их размеры примерно в 2-3 раза меньше.

На препаратах, окрашенных акридиновым оранжевым, выявляется их яркое зелёное свечение с оранжевой центральной частью. После разрушения симпластов сферические структуры окрашиваются в оранжевый цвет. Они полностью лизируются только после промораживания.

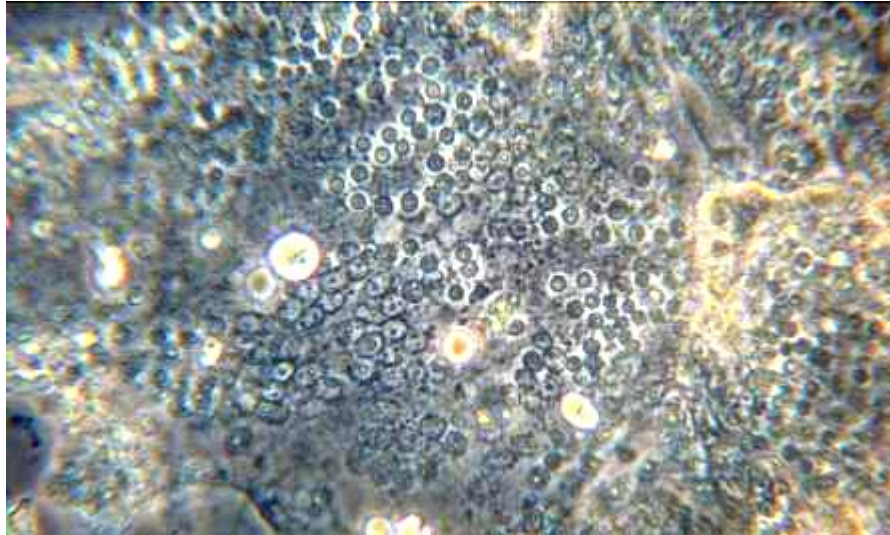


Рис. 3. Дегенерация цитоплазмы и ядер в симпластах культуры клеток Vero-V (72 часа, фазовый контраст).

Формирование таких сферических структур коррелирует с высоким титром метапневмовируса. Основная масса сформировавшихся симпластов на конечной стадии репродукции вируса может отслаиваться от субстрата и формировать трёхмерные структуры без разрушения общей наружной клеточной мембраны. На начальных стадиях инфекционного процесса (до 10 часов) в клетках Vero-V ещё наблюдаются митозы, но уже к концу первых суток все клетки вовлекаются в процесс формирования симпластов и репродукции вируса.

Морфологические изменения в клетках при репродукции метапневмовируса птиц, вероятно, аналогичны патологическому процессу воздействия микобактерий на альвеолярный эпителий животных.

Таким образом, в результате изучения репродукции штамма метапневмовируса подтипа В в клетках Vero-V было выявлено, что деструктивные изменения проявляются в слиянии клеток и образовании симпластов. Также мы наблюдали в гигантском симпласте наряду с ядрами нормального размера и ядра в несколько раз меньшие, что свидетельствует о трансформации ядер в сторону сверхспирализации ДНК. Динамика деструктивных изменений (или цитопатическое действие) находилась в прямой зависимости от инфекционной активности культивируемого вируса, что доказывают результаты титрования.

Пробы репродуцированного вируса отбирали через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения и определяли инфекционную активность вируса методом титрования в перевиваемой культуре клеток Vero-V. Результаты исследований представлены в таблице.

Таблица. Динамика накопления инфекционной активности
метапневмовируса птиц в культуре клеток Vero-V.

Вирус	Продолжительность инкубирования, часы			
	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³			
	24	48	72	96
Метапневмовирус птиц подтипа В	4,5 – 5,0	7,0 – 7,25	7,5 – 7,75	6,75 - 7,0

Из таблицы видно, что с увеличением времени культивирования вируса его инфекционная активность повышалась и достигала максимума к 72 часам, титр вируса составлял 7,5 - 7,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Выводы

Таким образом, установлено, что максимальное поражение клеток и монослоя Vero-V наступает через 72 часа инкубирования с метапневмовирусом птиц подтипа В, при этом титр инфекционной активности вируса достигает наивысшего значения - 7,5 – 7,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Список литературы

1. **Хлебовец З.Б., Пронин А.С., Борисова И.А., Старов С.К., Дрыгин В.В.** Выявление и типирование метапневмовирусов птиц в Российской Федерации. Материалы III международного ветеринарного конгресса по птицеводству, Москва, 2007 г.
2. **Cook, J. K. A.** Avian pneumovirus infections in turkeys and chickens. Vet. J., 2000, 160, 2: 118-123.
3. **Gough R, Collins M.S., Cox W.J. & Chettle N.J.** Experimental infections of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. Vet. Rec., 1988, 123: 58-59.
4. **Jones, R. C.** Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. Avian Pathol., 1996, 25: 639-648.
5. **Борисова И.А., Старов С.К., Сарбасов А.Б.** Изучение иммунобиологических свойств инаktivированной эмульсионной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной болезни птиц. Вет. Патология. 2007, 4: 137-141.
6. **Сергеев В.А.** Репродукция и выращивание вирусов животных. М.: Колос, 1976: 281 – 296.