Скрининг чувствительности культур клеток к вирусу мешотчатого расплода пчел

Screening of sensitivity of cell cultures to the sacbroodvirus of bees

Калинин А.Г.
г. Москва

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-2-17
УДК 619:578.085.23.002

Ключевые слова: пчелы, культура клеток, монослой, вирус мешотчатого расплода, ПЦР.

Key words: bees, cell culture, a monolayer, sacbrood virus, PCR

Резюме. В работе приведены результаты исследования чувствительности клеточных культур разного видового и тканевого происхождения к вирусу мешотчатого расплода пчел. Показано отсутствие ЦПД в ряде клеточных линий, но присутствие РНК вируса подтверждалось методом ПЦР с обратной транскрипцией.

Summary. In this article, we present the results of a study where we evaluated the sensitivity of different cell cultures characterized by diverse species and tissue origin to the sacbrood virus. The absence of CPD in a number of cell lines is shown, but the presence of RNA of the virus, confirmed by reverse transcription PCR.

Введение

Возможность культивирования клеток животных в искусственных условиях открывает перспективы моделирования сложных биологических процессов, а также позволяет изучать ответные реакции клеток на взаимодействия с различными патогенными факторами. В настоящее время клеточные культуры широко используются в ветеринарии и медицине для производства средств профилактики, терапии и диагностики инфекционных заболеваний, выделения и изучения вирусов, хламидий, токсоплазм, создания вакцинных препаратов и токсикологического тестирования лекарственных средств и химических реактивов (Дьяконов Л.П. с соавт. 2009, Величко Г.Н. с соавт., 2014, Гальнбек Т.В. с соавт., 2014).

Одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний пчел является мешотчатый расплод, который вызывается вирусом мешотчатого расплода (SBV) – РНК-

содержащий вирус, порядка Picornavirales, семейства Iflavidae, рода Iflavirus.

Впервые возможность размножения вируса мешотчатого расплода (SBV) *in vitro* изучил С. Vago (1959) на экплантатах яичников нимф маток пчел. Позднее рядом исследователей были предложены для культивирования SBV, в основном, культуры клеток, полученные от пчел или первичнотрипсинизированные культуры клеток куриных и мышинных фибробластов. Так, Смирновой Н.И. (1974 г) изучена возможность репликации вируса мешотчатого расплода в первичной культуре клеток фибробластов грудных мышц взрослой пчелы, а также куриных фибробластов. Другими исследователями также использовались первичные культуры клеток личинок рабочих пчел, почек обезьяны, мышинных фибробластов (Алексеев Ф.М. с соавт. 1991 г., Керимбаев А.К. 1972 г., Xiaocui Xia et al., 2014). Авторы отмечают, что наиболее чувствительными клеточными моделями, способными репродуцировать SBV, являются первичнотрипсинизированные культуры клеток, полученные из тканей пчел, куриных эмбрионов, мышей. Однако первичнотрипсинизированные культуры клеток, полученные от разных доноров, могут обладать различными характеристиками. В постоянных перевиваемых клеточных линиях стабильны культурально-морфологические характеристики и свойства культуры, что позволит получать объективные результаты опытов.

Первые попытки использовать постоянные линии клеток: HELA (человек, клетки карциномы шейки матки), HEP-2 (человек, раковые клетки эпителия гортани), СОЦ (обезьяна цинамобус, клетки сердца), Детройт 6 (человек, рак легких, клетки костного мозга), СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи), ВНК-21 (клетки почки сирийского хомячка) для культивирования SBV не привели к положительным результатам (Керимбаев А.К. 1972). Однако корейскими учеными установлено, что ряд постоянных линий клеток способен поддерживать размножение SBV (С.Н. Kweon et al. 2015). Ими показано, что вирус способен размножаться в постоянных линиях клеток Vero (почка зеленой мартышки), PK-15, IBRS-2 (почка свиньи) до 9 пассажа без проявления ЦПД и не размножается в Sf-9 (яичники куколки совки), что свидетельствует о необходимости дальнейших поисковых исследований в этом направлении с использованием более разнообразного спектра клеточных культур.

Таким образом целью нашей работы стал поиск перевиваемых клеточных линий различного тканевого и видового происхождения, которые чувствительны к вирусу SBV.

Материалы и методы

Культуры клеток, полученные из Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных и криобанка ВИЭВ, такие как клетки почки теленка (ПТ), кожа эмбриона овцы (КЭО), легкого плода коровы (ЛПК, ЛЭК), тестикулягненка (ТЯ), эпителия носовых раковин козы (ГТЕ), тестикул козленка (Ткоз), почки обезьяны (Vero K, Vero (получен из Германии)), почки свиньи (СПЭВ), клетки гибридного штамма свиньи* лошадь (A₄L) были выбраны для изучения возможности культивирования вируса мешотчатого расплода.

Авторы / Authors

Калинин А.Г., младший научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии и питательных сред, e-mail: kalinin.andrew2010@yandex.ru

Гальнбек Т.В., и.о. заведующего отделом клеточной биотехнологии и питательных сред, к.б.н.

Кулешов К.В., старший научный сотрудник отдела клеточной биотехнологии и питательных сред, к.б.н.

Сотников А.Н., и.о. заведующего лабораторией болезней пчел, к.в.н.

Володько Д. В., научный сотрудник лаборатории болезней пчел

Потапова И.В., лаборант отдела клеточной биотехнологии и питательных сред

ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук" г. Москва

Kalinin A.G., Galnbek T.V., Kuleshov K.V., Sotnikov A.N., Volodko D.V., Potapova I.V.

Рис.1 ок.10, об.20, ПТ,7 суток, контроль

Рис.2 ок.10, об.20, ПТ+SBV, 7 суток

Рис.3 ок.10, об.20 Vero K, 7 суток, контроль

Рис.4 ок.10, об.20 VeroK+SBV, 7 суток

тальной РНК осуществляли из 100 мкл. суспензии набором реагентов "РИБО-преп" (Амплисенс, Россия), согласно прилагаемой инструкции.

Конечный осадок тотальной РНК растворяли в 50 мкл РНК-буфера, 30 мкл брали на обратную транскрипцию. Последующую обратную транскрипцию проводили при 37 °С 30 мин с использованием набора реагентов "Реверта-Л" (Амплисенс, Россия). По окончании, пробу разбавляли ТЕ-буфером в 2 раза.

Для культивирования клеток использовали питательные среды: Игла MEM (A₄L, Vero (оба штамма), ЛЭК); смеси сред Игла MEM и 0,5% гидролизата лактальбумина (1:1) (ЛПК, КЭО, ТЯ, ПТ, GTE, Ткоз); 199 (СПЭВ) с добавлением 10% сыворотки КРС или эмбрионов КРС.

Клетки пересеивали с использованием смеси растворов 0,02% версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 9:1.

Материал для заражения получали от погибших личинок пчел из семьи пчел с классическими признаками проявления вируса мешотчатого расплода. Личинки растирали в фарфоровой ступке с физиологическим раствором. Центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость фильтровали через фильтры с размером пор 0,45 мкм и использовали для заражения клеточных культур.

Культуры клеток культивировали при температуре 37 °С до образования конфлюэнтного монослоя. Из культуральных флаконов с выросшим монослоем удаляли ростовую питательную среду и вносили вирусосодержащий материал с адсорбцией 1–2 часа с последующим удалением инокулума. Затем вносили поддерживающую питательную среду, идентичную ростовой для определенной клеточной культуры и культивировали при температуре 34 °С. Отбор образцов проводили через 6–14 суток культивирования и использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также для дальнейшего пассирования.

Детекция вируса SBV методом ПЦР

Материалом исследования служили, как гомогенат зараженных вирусом особей, так и образцы инфицированных культур клеток. Выделение то-

Постановку ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации (ПЦР-РВ) кДНК SBV проводили с использованием специфических праймеров (SBV_R1 и SBV_F1) и зонда (SBV_Zr) амплифицирующие фрагмент гена полипротеина длиной 235 нуклеотидов. Для оптимизации термодинамических характеристик (разность в температуре отжига праймеров и зонда), а также получения оптимальной длины ампликона, последовательности олигонуклеотидов SBV_R1 (CAC-ATG-CTC-CAT-AGT-CCA-CC), SBV_F1 (CGA-TGA-GGC-AAT-ATT-ATA-TGC-ACT-TTG) и SBV_Zr (FAM-TCC-ATA-GCA-GCC-TTC-GCT-ATT-TGA-G-BHQ) были выбраны собственноручно с использованием множественного выравнивания ранее секвенированных генов полипротеина вируса SBV, которые депонированы в GeneBank.

Для проведения амплификации готовили реакционную смесь объемом 25 мкл, содержащей 200 мкМдНТФ, ионы магния Mg²⁺ 1 мМ, по 3 пмоль прямого и обратного праймера и 1,5 пмоль зонда, 10 мклДНК и 1,5 ед. Taq-полимеразы в буфере ПЦР (60 мМTris-HCl (pH 8.5), 25 мМКСl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.1% Тритон X-100) ("СибЭнзим", Россия). ПЦР-РВ проводили на приборе Rotor-Gene™ 6000 (Австралия). Температурный профиль ПЦР был следующим: начальная денатурация – 95 °С 5 мин., 35 раундов: 95 °С – 15 с., 60 °С – 15 с. (детекция флуоресцентного сигнала), 72 °С – 15 с.

Результаты исследования и обсуждение

При скрининге клеточных культур на возможность репликации вируса мешотчатого расплода установлено, что в культурах клеток ТЯ, GTE вирус мешотчатого расплода пчел методом ПЦР не регистрируется. В клетках КЭО, ЛПК, Vero (полученный из Германии), ЛЭК, СПЭВ, Ткоз вирус обнаруживали методом ПЦР на 9, 12, 14 сутки культивирования в разных линиях клеток, а в клетках культур ПТ, A₄L, Vero K – на 6–8 сут. (Таблица 1).

Рис.5 ок.10, об.20, Т/коз, 7 суток, контроль

Рис.6 ок.10, об.20, Т/коз + SBV, 7 суток

Рис. 7 ок.10, об.20, ЛПК, 7 суток, контроль

Рис.8 ок.10, об.20, ЛПК+SBV, 7 суток

Таблица 1. Определение присутствия вируса мешотчатого расплода в культурах клеток методом ПЦР на разные сутки культивирования

Культ.	ТЯ	GTE	ПТ	КЭО	ЛЭК	ЛПК	Ткоз	Vero K	Vero получен из Германии	A ₄ L
сутки										
6-8	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
12-14	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Следует отметить, что первые-вторые сутки культивирования использованных культур клеток с вирусом монослой выглядел более плотным с четкими границами клеток, по сравнению с контролем. В клеточных моделях разного видового и тканевого происхождения ЦПД проявлялось по-разному. Так, в культуре клеток ПТ на 3–4 сут. наблюдали большое количество плавающих клеток. На 7–8 сут. культивирования отмечали образование пустот, дегенеративные изменения, на сохранившихся участках монослоя наблюдали пикноз ядер (рис.1,2).

Действие вируса с явным ЦПД отмечали в культуре клеток Vero K на 7 сут. в виде разрушения монослоя на 60–80%, образования стяжек и цитоагломератов (рис 3–4).

В культуре клеток тестикулов козленка на 7–9 сут. наблюдали формирование бесструктурных образований, отмечали много плывущих клеток, однако, разрушения монослоя не обнаруживали (рис.5,6)

В клетках легкого плода коровы (ЛПК, ЛЭК) нарушения целостности монослоя вирусом мешотчатого расплода не отмечали. На поверхности монослоя культуры клеток ЛПК наблюдали наличие округлых клеток (рис.7–8).

В постоянных клеточных линиях КЭО, А4L, СПЭВ, Vero (полученный из Германии) видимых проявлений ЦПД не регистрировали, однако, наличие вируса мешотчатого расплода пчел подтверждали при помощи метода ПЦР.

На основании проведенных исследований можно отметить, что для ряда клеточных культур характерен цитопатогенный эффект при воздействии вируса, что согласуется с данными, полученными Смирновой Н.И. (1974г). Однако изучение механизмов, с помощью которых он возникает, требует дальнейшего исследования.

Интересно, что в этой работе мы также демонстрируем отсутствие ЦПД в ряде клеточных линий, но присутствие РНК самого вируса. Так в клеточных культурах КЭО, СПЭВ, ЛЭК, А4L, Vero (полученный из Германии) вирус не вызывал заметных изменений в монослое клеток, хотя методом ПЦР нам удавалось его обнаружить. Данный факт согласуется с ранее проведенными исследованиями (С.Н. Kweonet al., 2015).

Несмотря на то, что в данной работе мы не обнаружили клеточной модели, которая способствовала бы накоплению вируса в высоком титре, поиск клеточной модели для репродукции SBV остается актуальным.

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., тема №0578-2014-0021. Финансирование работы было получено в рамках государственного задания из федерального бюджета без привлечения дополнительных источников финансирования.

Все авторы данной публикации подтверждают отсутствие каких-либо конфликтов интересов.

Литература

1. Алексеенко Ф.М., Ревенок В.А., Чепурко М.А. Справочник по болезням и вредителям пчел/ - 2-е изд., перераб. и доп.-К.: Урожай, 1991, С.83
2. Величко Г.Н., Шуляк А.Ф., Журавлева Е.А., Гальнбек Т.В., Ломакина Н.Ф. Оценки вирусологических и молекулярных методов в диагностике вирусной диареи - болезни слизистых оболочек КРС. Ж. Ветеринария и кормление, 2014, №5, С. 66-67
3. Гальнбек Т.В., Шуляк А.Ф., Акиншина Г.Т., Потапова И.В., Федоров А.И. Влияние азотнокислого лантана на клетки легкого плода КРС "ЛПК" *in vitro*. Ж. Ветеринария и кормление, 2014, №5, С. 68-69
4. Дьяконов Л.П., Акиншина Г.Т., Билько Н.М., Гальнбек Т.В. и др. Животная клетка в культуре. Издание 2-е дополненное, Компания спутник, Москва, 2009, 654 с.
5. Керимбаев А.К. Изучение некоторых биологических свойств вируса мешотчатого расплода у личинок медоносной пчелы и усовершенствование методов лабораторной диагностики заболевания, Дисс. К.б.н., 1972, Москва
6. Смирнова Н.И. Использование куриных и пчелиных фибробластов для выделения и культивирования вируса- возбудителя мешотчатого расплода пчел, Сборник работ "Новое в разведении и генетике сельскохозяйственных животных", выпуск XXXV, Ленинград, 1974, С.97-98
7. Kweon C.H., Yoo M.S., Noh J.H., Reddy K.E., Yang D.K., Cha S.H., Kang S.W. Derivation of cell-adapted Sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee, *Virus Research*, 198, 2015, P. 15-21
8. Vago C. Culture de tissus d'invertebres, *Atti. simposio intern. Bibl. speriment.*, Pavia, mai, 1959, P. 9-11
9. XiaX., MaoQ., WangH., ZhouB., WeyT. Replication of Chinese sacbrood virus in primary cell cultures of Asian honeybee (*Apis cerana*), *Arch Virol*, 159, 2014, 3435-3438, P. 3435-3436