

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

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

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

*При оцінці епідемічної небезпеки поширеності вірусних інфекцій велике значення набуває питання тривалості виживання ентеровірусів. Це питання особливо актуальне у зв'язку з тим, що віруси, завдяки своїм біологічним особливостям (внутрішньоклітинні паразити), не розмножуються у зовнішньому середовищі, а тільки знаходяться в ньому. Метою роботи було порівняльне вивчення динаміки збереження інфекційності клінічних ізолятів і прототипних штамів вірусів Коксаки В у лабораторних умовах. У дослідженнях використовувалися музейні прототипні ізоляти вірусів Коксаки В3 та Коксаки В6. Наявність ентеровірусів в клінічному матеріалі підтверджували молекулярно-генетичними методами, а саме, постановкою полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Результати експериментів свідчать про досить високу стійкість досліджуваних вірусних популяцій при + 4 °С. При зростанні температури зберігання зафіксовано зниження резистентності ентеровірусів. Так, при 20°C більшість досліджуваних зразків інактивувались вже на 60 добу спостереження, хоча, слід зазначити, що клінічні ізоляти проявляли трохи більшу стійкість при даних умовах зберігання: вони залишалися інфекційними на 60 добу спостереження в титрі 1,0 Іg<sup>10</sup>. При температурі 37 °С динаміка інактивації клінічних і прототипних штамів вірусів Коксаки В3 та Коксаки В6 відбувалася практично однаково: вже на 36 добу зберігання в дослідних зразках інфекційних вірусних агентів зафіксовано не було. В цілому зафіксовано вищу резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксаки В у порівнянні з музейними прототипними штамми даних мікроорганізмів. Крім того, результати досліджень свідчать про зниження резистентності клінічних ізолятів вірусів Коксаки В після їх тривалого культивування в культурах клітин. Резистентність клінічних ізолятів вірусів Коксаки В, які пройшли по шість пасажів на культурі клітин не відрізняється від резистентності лабораторних штамів даних вірусів.*

**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 зарезистентністю при 40°C [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.** В дослідженнях використовувались 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 товстої кишки.

Для культивування вірусів використано перещеплювані культури клітин: НЕР-2 (Circinnati). Усі роботи з культурами клітин проводились у відповідності з методичними рекомендаціями ВООЗ [2]. Видову приналежність 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 Boometal. [3]. Ампліфікацію вірусної ДНК проводили на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням "GeneAmp PCR System 2400"

(США) у відповідності до інструкції виробника. В реакції використовували реагенти тест-системи "EutroVirus-EPH" (АмпліСенс®, РФ). Наявність та якість ПЛР-продуктів аналізували методом гел-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 етидія броміду.

Отримані кількісні результати досліджень оброблені загальноприйнятими методами варіаційної і кореляційної статистики з використанням значень середньої арифметичної (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 та 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 діб спостереження. Титр лабораторних штамів вірусів Коксакі В3 та В6 на 90 добу спостереження склав 1,0 I<sub>g<sub>10</sub></sub>, натомість титр клінічних ізолятів Коксакі В3 та Коксакі В6 становив 1,5 I<sub>g<sub>10</sub></sub> та 1,75 I<sub>g<sub>10</sub></sub> відповідно.

Резистентність ентеровірусів в цілому знижувалась при зростанні температури зберігання. Так, при 20°С більшість досліджуваних зразків інактивувались вже 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 I<sub>g<sub>10</sub></sub>. При температурі 37 °С 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°С. Для роботи брали віруси, які пройшли по шість пасажів на культурі клітин HEp-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

Таблиця 1

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 4°С

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 штам.

Таблиця 2

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 20°С

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 штам.

Таблиця 3

Динаміка збереження інфекційності вірусів клінічних ізолятів та лабораторних штамів вірусів Коксакі В при 37°С

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 штам.

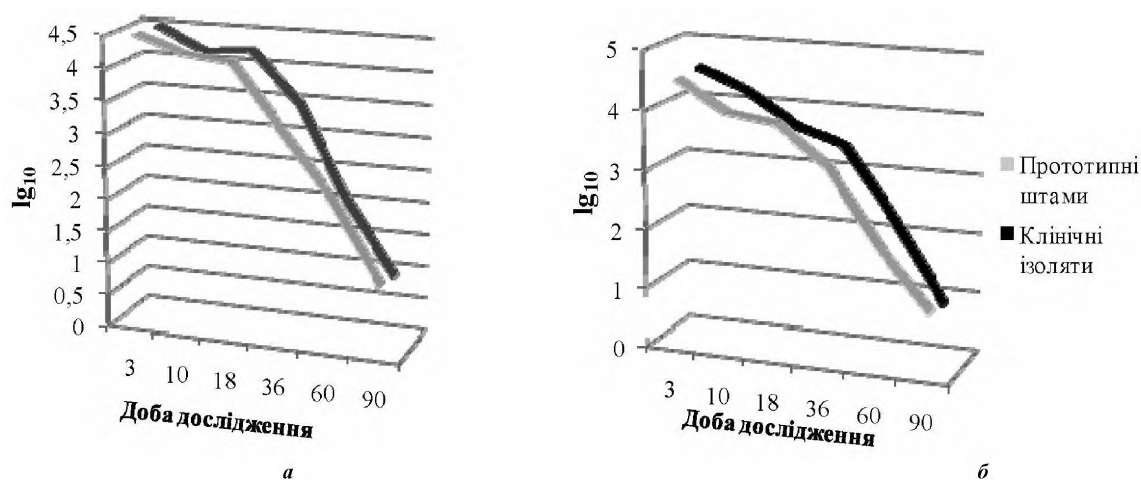
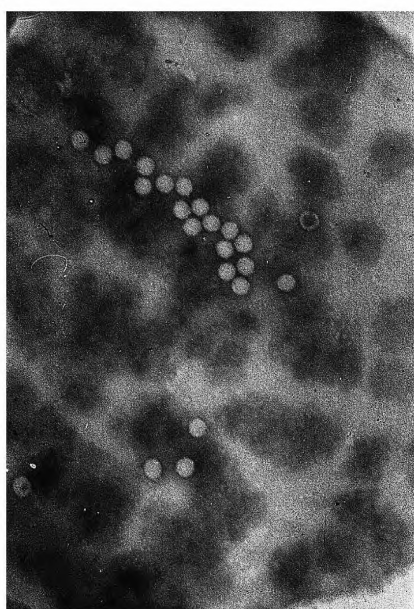
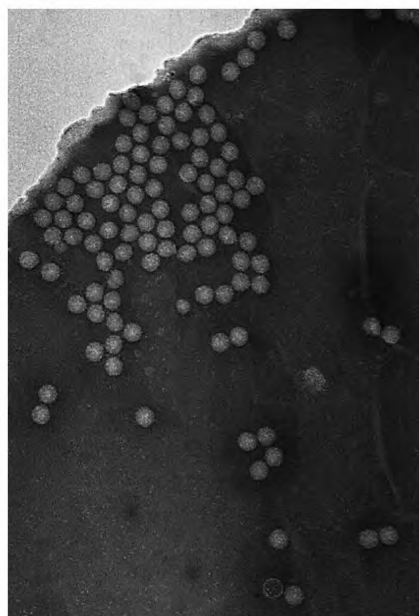


Рис. 1. Вживаність клінічних ізолятів вірусів Коксакі В після пасажування у культурі клітин +4°C: а – Коксакі В3, б – Коксакі В6.



а



б

Рис. 2. Електронна мікроскопія. Збільшення 60 000. а – Клінічні ізоляти Коксакі В3; б – Музейні прототипні штами Коксакі В3.

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 вірусами (рис. 2). Разом з тим, було встановлено, що вони морфологічно 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 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

#### Висновки.

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

2. Зафіксовано вищу резистентність у клінічних ізолятів вірусів Коксакі В у порівнянні з лабораторними штамими при зберіганні за температури +4°C та +20°C.

3. Зафіксовано зниження стійкості клінічних ізолятів вірусів Коксакі В при зростанні частоти пасажів у культурі 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 Коксаки В свідчить про їх абсолютну ідентичність.

Немає ніякого конфлікту інтересів який міг би завдати шкоди неупередженості дослідження. Дане дослідження не отримало ніякої фінансової підтримки від державної, громадської чи комерційної організації.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ворошилова М.К. Энтеровирусные инфекции человека: Монография. – М.: Медицина, 1979. – 358
2. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. – ВОЗ. – Женева. – 2005.
3. Boometal. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids / Journal of clinical microbiology, Mar. 1990, p. 495-503.

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

Понятовский В.А., Бобырь В.В., Настенко В.Б.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

При оценке эпидемической опасности распространения вирусных инфекций большое значение приобретает вопрос продолжительности выживания энтеровирусов. Этот вопрос особенно актуален в связи с тем, что вирусы, благодаря своим биологическим особенностям (внутриклеточные паразиты), не размножаются во внешней среде, а только находятся в ней. Целью работы было сравнительное изучение динамики сохранения инфекционности клинических изолятов и лабораторных штаммов вирусов Коксаки Вв лабораторных условиях. В исследованиях использовались музейные прототипные штаммы и клинические изоляты вирусов Коксаки В3 и Коксаки В6. Наличие энтеровирусов в клиническом материале подтверждали молекулярно-генетическими методами, а именно, постановкой полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Результаты экспериментов свидетельствуют о достаточной высокой устойчивости исследуемых вирусных популяций при + 4 °С. При росте температуры хранения зафиксировано снижение резистентности энтеровирусов. Так, при 20°С большинство исследуемых образцов инактивировались уже на 60 сутки наблюдения, хотя, следует отметить, что клинические изоляты проявляли несколько большую устойчивость при данных условиях хранения: они оставались инфекционными на 60 сутки наблюдения в титре 1,0 Ig<sup>10</sup>. При температуре 37 °С динамика инактивации клинических и прототипных штаммов вирусов Коксаки В3 и Коксаки В6 происходила практически одинаково: уже на 36 сутки хранения в опытных образцах инфекционных вирусных агентов зафиксировано не было. В целом отмечено более высокую резистентность клинических изолятов вирусов Коксаки В по сравнению с музейными прототипными штаммами данных микроорганизмов. Кроме того, результаты исследований свидетельствуют о снижении резистентности клинических изолятов вирусов Коксаки В после длительного культивирования в культурах клеток. Резистентность клинических изолятов вирусов Коксаки В, прошедших по шесть пассажей на культуре клеток не отличается от резистентности лабораторных штаммов данных вирусов.

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

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

V.A. Poniatowsky, V.V. Bobyr, V.B. Nastenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

The problem of enteroviruses survival has the great importance when correct estimate forms about the danger of the viral infections epidemic spread. The particular relevance of this problem associated with biological characteristics of viruses, which are only present in the environment, but do not multiply in it. The purpose of this study is comparative analysis of conservation of infectivity Coxsackie B clinical isolates and laboratory strains in vitro. Museum prototypic strains and clinical isolates of virus Coxsackie B and Coxsackie B6 have been used in studies. Molecular genetic methods, namely PCR, were used to verification of the presence of virus in clinical samples. The experimental results indicate about high stability comparatively of studied viral populations at 4°C. The sharp decline of enteroviruses resistance during temperature increases. At 20°C most of the samples inactivated to 60 days of research. Although it should be noted than clinical isolates demonstrated more stability at 20°C: its kept infectivity to 60 days of research in titer 1,0Ig<sup>10</sup>. Dynamics of clinical and prototypical strains of Coxsackie B3 and Coxsackie B6 inactivation was almost the same: already at 36 storage hours viral infectious agents were not detected in prototypes. Higher resistance of Coxsackie B clinical isolates has been noted compared with museum prototypical strains of these microorganisms. Besides, results of research point the decline of Coxsackie B clinical isolates resistance after prolonged cultivation in cell culture. Coxsackie B clinical isolates resistance does not differ from laboratory strains resistance of these microorganisms after six passages.

**Keywords:** enteroviruses, infectivity, cell cultures, resistance.