

низме при бактериологическом исследовании.

На вскрытии морских свинок патологоанатомические изменения обнаружены в основном у животных контрольной группы. У всех свинок этой группы селезенка была увеличена, в отдельных случаях бугристая, а из лимфатических узлов изменения наблюдались в основном в паховых правых (регионарных к месту введения вирулентной культуры). Они были сильно увеличены. У 4 животных из 10 были увеличены также шейные лимфоузлы.

Результаты бактериологического исследования представлены в таблице 2.

Из анализа данных таблицы 2 видно, что иммуногенная активность изучаемых вакцин была различной. Наиболее иммуногенной для морских свинок оказалась инактивированная адъювант-вакцина «ЭВАК». Из 10 иммунизированных этой вакциной морских свинок экспериментальному заражению 100 ИД<sub>100</sub> культуры *Bt. ovis* 8406 противостояло 8 голов (80%), а из 10 морских свинок, привитых вакциной из штамма *Bt. melitensis* Rev-I, — 6 голов (60%).

Все контрольные (не вакцинированные) морские свинки заразились. У них

развился генерализованный инфекционный процесс. При этом выделена 41 культура: 28 из лимфоузлов, 13 — из органов. Это служит основанием судить о том, что для заражения подопытных и контрольных животных была взята достаточная доза вирулентного штамма *Bt. ovis* 8406.

У морских свинок, привитых инактивированной адъювант-вакциной «ЭВАК», положительная РДСК с овисным антигеном и РСК, РА, РБП с бруцеллезным единым антигеном получена через 15, 30, 60, 90 и 120 дней после иммунизации и через 15, 30 дней после заражения у всех животных.

У морских свинок, привитых живой вакциной из штамма Rev-I *Bt. melitensis*, РДСК с овисным антигеном была отрицательной во все сроки исследования у всех животных, а РСК, РА и РБП с бруцеллезным единым антигеном — положительной.

#### Заключение

При однократной иммунизации морских свинок инактивированной адъювант-вакциной «ЭВАК» и живой вакциной из штамма Rev-I *Bt. melitensis* и при заражении их вирулентной культурой *Bt. ovis* 8406 иммуногенность вакцин составила 80 и 60% соответственно.

УДК 578.832.1:578.23

**Р.Я. Подчеряева, Е.И. Исаева, Г.А. Данлыбаева, Г.Р. Михайлова**

## РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МОЗГА ХОРЬКА *MUSTELA PUTORIUS FURO*

В настоящее время в мире отмечается сложная эпидемиологическая ситуация, т.к. с 1997 г. отмечаются вспышки птичьего гриппа (H5N1, H7N7, H9N2), который не только приводит к гибели домашних птиц, но и вызвал около 300 случаев заболевания человека с высоким уровнем летальности [8, 10].

Известно, что наиболее перспективной моделью для изучения вирусов гриппа являются хорьки, которые в силу экономических причин не всегда доступны исследователям. Поэтому нами для изучения птичьего вируса H5N1 применялась клеточная линия мозга хорька (Mpf) из Коллекции культур клеток Института вирусологии, представленной в отечественных и зарубежных каталогах.

Рядом исследователей было отмечено,

что в последние эпидемии гриппа, вызванные вирусом А (H3N2), с 1998 г. среди больных нередко наблюдались проявления неврологического синдрома [3, 15].

Исходя из этого, мы изучили репродукцию вирусов гриппа человека H1N1, H3N2 и В, выделенных не только в последние, но и более ранние эпидемические годы, на модели клеток Mpf, а также другой нервной ткани (глиобластоме человека GL6) в сравнении с 2 другими клеточными линиями: почек собак (MDCK) и клетками легкого эмбриона человека (ЛЭЧ).

#### Материалы и методы исследования

Культуры перевиваемых клеток: линия нервных клеток мозга хорька (Mpf) культивируется в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) фирмы «ПанЭко» с индексом пролифера-

Репродукция птичьего вируса H5N1 в культурах клеток (lg ТЦД 50)

Штамм	Культуры клеток						
	МДСК	СПЭВ	Vero	L 929	L 41	Клон 1-5с-4	Mrf
А/крачка/Южная Африка/61	4,5	4,5	3,0	4,0	3,5	2,0	<1,0

Титры гемагглютининов и инфекционной активности вирусов гриппа H1N1 (lg ТЦД 50)

Клетки	A/PR8/34	A/FM1/47	A/СССР90/77	A/Новая Каледония 20/99
Mrf	4,0	2,5	3,0	2,0
МДСК	4,0	4,0	3,0	2,5
ЛЭЧ	2,5	2,0	2,0	1,5
GL6	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

ции (ИП)=3,6–5,4; глиобластома человека (GL6) – ростовая среда DMEM+10% ЭТС, ИП=3,0–3,6; диплоидные клетки легкого эмбриона человека (ЛЭЧ) – ростовая среда Игла MEM и 199 (1:1) + 10% ЭТС, ИП=2,0–2,2; линия почек собак (МДСК) – ростовая среда Игла + 10% ЭТС, ИП=3,3–4,0; линия почек свиньи (СПЭВ) – ростовая среда 199 + 10% КРС, ИП=5,0; линия почек обезьян (Vero) – ростовая среда Игла MEM + 10% ЭТС, ИП=4,0; линия мышинных фибробластов (L 929) – ростовая среда 199 + 7% ЭТС, ИП=5,0; линия клеток костного мозга больного лейкоемией человека (L 41), ростовая среда Игла MEM + 10% ЭТС, ИП=4,0; линия конъюнктивы человека (клетки Chang conjunctiva клон 1-5с-4) – ростовая среда Игла + 10% ЭТС, ИП=3,0. К питательным средам добавляли 10 мМ глутамина и антибиотики. Клетки культивировали при 37°С в термостате с 5% CO<sub>2</sub> в 96 – луночных панелях фирмы «Costar» по общепринятому методу. Посевная доза клеток составляла 200 000 клеток/мл. В качестве поддерживающей среды использовали ростовую среду, но без сыворотки.

Вирус гриппа птиц (H5N1): эталонный штамм А/крачка/Южная Африка/61.

Вирусы гриппа человека H1N1: штаммы А/PR8/34; А/FM1/47; А/СССР/90/77; А/Новая Каледония 20/99; вирусы гриппа H3N2: штаммы А/Гонконг1/68, А/Москва/10/99, А/Кумамото/102/02; вирусы гриппа В: штаммы В/Гонконг1/72, В/Яманаша/166/98, В/Сичуань 370/99.

Все штаммы вируса гриппа применялись в виде аллантоисной жидкости с титрами гемагглютининов (ГА) 1/40 – 1/160. Инфекционный титр вирусов представлен в lg ТЦД 50.

#### Результаты и обсуждение

Прежде чем приступить к изучению репродукции вирусов гриппа в клеточных культурах, нами проведено морфологи-

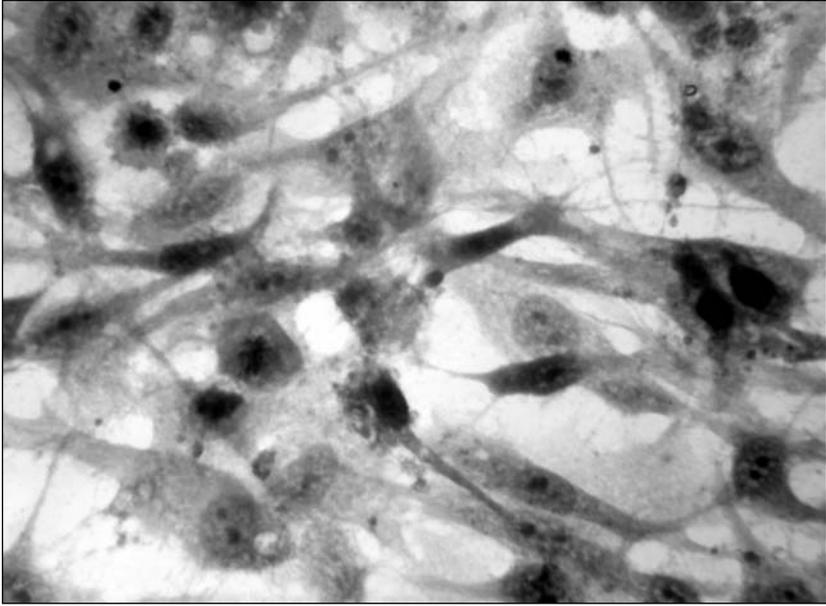
ческое и кариологическое изучение клеток Mrf. Необходимо отметить, что в отличие от клеточных линий МДСК, ЛЭЧ, GL6, подробно охарактеризованных и представленных в наших каталогах [7, 13, 14], клетки Mrf, поступили к нам из АТСС (США). Известно, что они были получены в 1976 г. R.S.Trowbridge из нормальной ткани мозга 6-недельного хорька. По нашим данным, эта культура состоит из полиморфных нервных клеток (рис. 1). Хромосомный анализ показал, что модальный класс составляют клетки с 38 хромосомами (2n=40), разброс клеток от 29 до 40 хромосом, т.е. линия клеток Mrf является околодиплоидной (рис. 2).

Еще в 1991 г. нами было показано, что вирусы гриппа птиц могут размножаться в ряде клеточных культур [2]. В частности, вирус гриппа птиц, изолированный в нашей стране с 5 типом гемагглютинина (штамм А/морской голубок/Астрахань/76-H5N1) активно репродуцировался не только в клетках почки собаки (МДСК), но и в других почечных линиях: свиньи – СПЭВ, обезьян – 4647, крупного рогатого скота – ПЭК и сирийского хомячка – ВНК-21.

В данной работе представлены результаты изучения репродукции штамма А/крачка/Южная Африка/61 (H5N1) в различных клеточных культурах (таблица 1).

Из таблицы видно, что птичий вирус H5N1 активно репродуцируется в клеточных линиях МДСК, СПЭВ, L929 (4,0–4,5 lgТЦД 50), несколько слабее (3,5–2,0 lgТЦД 50) в клетках Chang conjunctiva, (клон 1-5с-4), L 41, Vero и совсем не размножается в культуре клеток мозга хорька Mrf (<1,0 lg ТЦД 50).

Рядом исследователей ранее было проведено изучение и выявлены различия антигенных и других биологических свойств штаммов вирусов гриппа, выделенных в разные эпидемические годы [1, 2, 4, 5, 11, 12]. В 1991 г. нами было показано, что ви-



**Рисунок 1.** Морфология линии клеток мозга хорька Mrf. Окраска гематоксилин-эозином ув. ок. 10 х об 100

русы гриппа человека, как и вирусы гриппа животных, могут размножаться в ряде клеточных культур [1]. Так, штаммы A/PR8/34 и A/FM1/47 (H1N1), так же активно, как и в клетках MDCK, репродуцируются в культурах клеток СПЭВ, ВНК-21, конъюнктивальных клетках человека (клон 1-5C-4), в клетках почек обезьян (4647) и диплоидных клетках легкого эмбриона человека M22. Штаммы A/Сингапур 1/57 и A/СССР/05/80 (H3N2) наряду с репродукцией в клетках MDCK, тоже активно размножались в большинстве вышеперечисленных клеточных линий. Вирусы гриппа В (штаммы В/Ли/40, В/Сингапур 222/79, В/СССР 100/83) активно репродуцировались в клетках MDCK, СПЭВ и M22.

В данной работе (таблица 2) представлены результаты изучения репродукции вирусов гриппа H1N1, изолированных в периоды эпидемий 1934, 1977 и 1999 гг. на 4 клеточных линиях (Mrf, MDCK, ЛЭЧ, GL6).

Из таблицы 2 видно, что вирусы гриппа H1N1 репродуцируются в культуре нервных клеток хорька (Mrf) в такой же степени, как и в клетках MDCK, но не размножаются в нервных клетках человека (GL6). Отмечается также слабая степень репродукции вирусов H1N1 в клетках легкого эмбриона человека (ЛЭЧ). Интересно, что не наблюдалось различий в степени репродукции вирусов гриппа H1N1, выделенных в эпидемии 1934, 1947, 1977 и 1999 гг., несмотря на различие их антигенных и

Таблица 3  
**Титры гемагглютининов и инфекционной активности вирусов гриппа H3N2 (lg ТЦД 50)**

Клетки	А/Гонконг1/68	А/Москва10/99	А/Кумамото102/02
Mrf	3,5	3,5	2,5
MDCK	4,5	4,0	3,0
ЛЭЧ	2,5	2,5	2,0
GL6	<1,0	<1,0	<1,0

Таблица 4  
**Титры гемагглютининов и инфекционной активности вирусов гриппа В (lg ТЦД 50)**

Клетки	В/Гонконг/72	В/Яманаша 166/98	В/Сичуань 379/99
Mrf	<1,0	<1,0	<1,0
MDCK	4,0	3,5	4,0
ЛЭЧ	1,5	1,0	1,5
GL6	<1,0	<1,0	<1,0



**Рисунок 2.** Хромосомы линии клеток мозга хорька Mrf. Окраска азур-эозином по Романовскому. ув. ок. 10 х об 40

биологических свойств.

Результаты изучения репродукции вирусов гриппа H3N2 на этих же 4 клеточных линиях представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, вирусы гриппа H3N2, так же как и вирусы H1N1, репродуцируются в клетках Mrf практически в той же степени, как и в клетках MDCK и несколько слабее в диплоидной линии клеток ЛЭЧ.

Отличий в активности репродукции штаммов, выделенных в эпидемии гриппа H3N2 (1968, 1999 и 2002 гг.) также не отмечено, как и у вирусов гриппа H1N1.

Результаты изучения вирусов гриппа В на тех же клеточных культурах представлены в таблице 4.

Из таблицы 4 можно видеть, что вирусы гриппа В репродуцируются только в клетках MDCK и значительно слабее в клетках ЛЭЧ. Грипп В совсем не размно-

жается в клетках глиобластомы человека (GL6) и нервных клетках мозга хорька (Mrf), что может служить дифференциальным отличием их от вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2).

Различий репродукции штаммов вирусов гриппа В, изолированных в эпидемии 1972, 1998 и 1999 гг., не наблюдалось, так же, как и у штаммов вирусов гриппа А.

Таким образом, нами впервые показано, что для вирусов гриппа человека типа А чувствительной клеточной моделью являются нервные клетки мозга хорька. Эта клеточная линия может быть использована как для изоляции вирусов гриппа, так и для проведения различного рода молекулярно-биологических исследований. Интересно, что для птичьего вируса H5N1 эта клеточная линия, как и для вируса гриппа человека типа В, не является перmissiveй.

#### РЕЗЮМЕ

Проведено изучение репродукции птичьего вируса H5N1 и вирусов гриппа человека А и В, выделенных в различные эпидемические годы, на разных клеточных линиях. Показано, что птичий вирус активно репродуцируется в почечных клетках свиней, собак, обезьян и не размножается в культуре клеток мозга хорька (Mrf). Установлено, что для вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) чувствительной моделью, кроме клеток MDCK, являются клетки мозга хорька. Вирусы гриппа В в этих клетках не репродуцируются, как и птичий вирус H5N1.

#### SUMMARY

Reproduction of bird virus H5N1 and human influenza viruses A and B, isolated at different epidemic years on the different cell lines, was studied. It was shown that the bird virus actively reproduced in the kidney cells of pigs, dogs, monkeys and don't multiply in cell culture of hamster brain (Mrf). It was established that for the influenza viruses A (H1N1 and H3N2) most sensitive model, besides cells MDCK, was hamster brain cell line. Influenza virus B in these cells don't multiply, as well as a bird virus H5N1.

## Литература

1. Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я., Саятов М.Х., Мезенцева М.В. Изучение чувствительности ряда клеточных культур к различным типам вирусов гриппа и реассортантов. *Вопр. вирусол.* 1991. № 1. С. 10–13.
2. Данлыбаева Г.А., Подчерняева Р.Я., Саятов М.Х. Репродукция вирусов гриппа человека и животных в первичных и перевиваемых клеточных культурах. Сб. науч. тр. «Биология вирусов гриппа человека и животных». Алма-Ата, 1991. С. 139–146.
3. Исаева Е.И., Колобухина Л.В., Ровнова З.И., Алипова Т.А. Иммунологический анализ эпидемической ситуации по гриппу в сезоне 1997–1998 г. Сб. науч. тр. «Патогенетические основы лечения острых инфекционных заболеваний». М., 1999. С. 187–196.
4. Исаева Е.И., Иванова В.Т., Ровнова З.И. и др. Картирование сайтов гемагглютинина вирусов гриппа H3N2 1990–1993 г. // *Вопр. вирусол.* 1994. № 2. С. 62–65.
5. Исаева Е.И., Ровнова З.И., Подчерняева Р.Я. Функциональная активность моноклональных и моноспецифических антител при взаимодействии с антигенными сайтами гемагглютинина вируса гриппа // *Вопр. вирусол.* 1995. № 1. С. 27–30.
6. Исаева Е.И., Колобухина Л.В., Ровнова З.И. и др. Клинико-иммунологическая характеристика больных гриппом в сезон 1996–1997 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 1999 г. № 6. С. 10–15.
7. Каталог Всесоюзной коллекции клеточных культур. Санкт-Петербург: Наука. 1991 119 с.
8. Липатов А.С., Смирнов Ю.А., Каверин Н.В., Вебстер Р.Г. Эволюция вирусов гриппа птиц H5N1 с 1997 г. по 2004 г. в Южной и Юго-Восточной Азии. *Вопр. вирусол.* 2005. № 4. С. 11–17.
9. Львов Д.К., Андреев В.Л., Брауде Н.А. и др. Изоляция вирусов гриппа с антигенной формулой H4N4 и H5N2 в период эпизоотии среди чайковых птиц летом 1976 г. в Астраханской области // *Вопр. вирусол.* 1976. № 4. С. 399–403.
10. Львов Д.К., Ямникова С.С., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. Межпопуляционные взаимодействия в системе вируса гриппа А — животные-человек // *Вопр. вирусол.* 2005. № 4. С. 11–17.
11. Подчерняева Р.Я., Рогачева Т.А., Щипанова М.В., Ровнова З.И. Характеристика биологических и антигенных свойств эталонных штаммов вируса гриппа В различных лет выделения // *Вопр. вирусол.* 1986. № 1. С. 31–36.
12. Подчерняева Р.Я., Елкин В.С., Щипанова М.В. Антигенные и иммунологические характеристики эпидемических и рекомбинантных, штаммов вирусов гриппа В // *Иммунология.* 1989. № 6. С. 89.
13. Catalogue Russian cell culture collection (RCCC). St. Petesburg, 1999. 204 С.
14. Human and Animal cell lines Catalogue 1993. Data bank for biomedical Research. Interlab Project., 1993, 443 P.
15. Smidt M.H., Stroink H., Brunenberg J.F., Plecters M. Encephalopathy associated with influenza A. *Paediatric Neurology* 2004 Vol 8 (5). P.257–260.

М.А. Иващук

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭНТЕРОКОККОВ И ЭШЕРИХИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПРОМЫШЛЕННОЙ ПТИЦЫ

Энтерококки являются частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных (наиболее часто в испражнениях животных встречаются *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*). Несмотря на это энтерококки все чаще расцениваются как один из важнейших возбудителей факторных инфекций. Особенно часто такие инфекции развиваются в организме в условиях иммуносупрессии и приводят к развитию сепсиса. Энтерококковая инфекция является одним из наиболее распространенных бактериальных заболеваний промышленной птицы. Непосредственным источником инфекции, как правило, является собственная микрофлора (эндогенное инфицирование), а основным резервуаром *Enterococcus spp.* является кишечная микрофлора. Чаще всего возбудителем данного заболевания является *Enterococcus faecalis*, хотя определен-

ную этиологическую роль играет и *Enterococcus faecium*.

Технологической особенностью птицеводческих хозяйств являются сравнительно частые (например, по сравнению с животноводческими хозяйствами) антибиотикопрофилактики и антибиотикотерапии, носящие массовый характер, т.е. проводимые в отношении всего птицепоголовья либо его части. Лекарственные препараты чаще всего вводят в организм птицы перорально (с кормом или водой). При этом кишечная микрофлора очень часто подвергается действию антибиотиков, что обуславливает появление высокорезистентных штаммов *E. coli*, *Enterococcus spp.* и пр.

### Материалы и методы

Материалом для исследований служили 46 изолятов *Enterococcus faecalis*, 37 изолятов *Enterococcus faecium* и 32 изолята *E. coli*, выделенных из сердца, пече-