

Исследование сывороток крови домашних птиц, иммунизированных инактивированной вакциной против гриппа птиц подтипа H5

№ группы	Дни после вакцинации	Титр в РТГА (\log_2) с антигеном вируса ГП H5N1	ИФА Syn-biotics	РДП
1	35	7,1 (10/10 ¹)	10/10	10/10
2	35	8,9 (24/24)	н/и ²	н/и
3	28	6,0 (9/10)	9/10	9/10
4	18–20	5,5 (37/45)	н/и	н/и
5	28	8,0 (10/10)	10/10	10/10
Положительный контроль (H5N1)		9,0	1:6300	+ ³
Отрицательный контроль		- ⁴	-	-

1 — количество положительных проб к общему количеству проб; 2 — не исследовали; 3 — положительный результат; 4 — отрицательный результат

птиц в серологических реакция, таких как реакция торможения гемагглютинации, реакция диффузной преципитации и иммуноферментный анализ, позволяло получать достоверные результаты о наличии анти-тел к вирусу гриппа типа А подтипа H5 у диких птиц и определять уровень специфических антител у вакцинированных птиц.

РЕЗЮМЕ

Специфические антитела к высоковирулентному вирусу гриппа типа А подтипа H5 обнаруживали в сыворотках крови диких водоплавающих птиц при комплексном исследовании в серологических реакциях, в то время как в сыворотках крови кур не вакцинированных против гриппа не выявляли антитела к данному подтипу. После иммунизации домашних птиц инактивированной вакциной против гриппа птиц подтипа H5N1 специфические антитела регистрировали на 28–35 день в РТГА в титрах не ниже 7 \log_2 .

ABSTRACT

Specific antibodies to highly virulent avian influenza virus type A subtype H5 were detected in blood sera from wild waterfowl by serological tests during a complex study, while in blood sera from chickens non-vaccinated against avian influenza antibodies to that subtype were not detected. After immunization of poultry with inactivated H5N1 avian influenza vaccine specific antibodies were detected on day 28–35 using hemagglutination inhibition test at titres not less than 7 \log_2 .

Литература

- Лагуткин Н., Лутовинов В. Непредсказуемость гриппа // Птицеводство. 2001. № 6. С. 27–30.
- Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M. et al. Fouchier, R.A.M. Characterization of novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // Journal of Virology. 2005. Mar. P. 2814–2822.
- Hinshaw V.S., Shreerar M.G., Larsen D. Specific antibody responses and generation of antigenic variants in chickens immunized against a virulent avian influenza virus // Avian Disease. 1990. V. 34. P. 80–86.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) // OIE. Fifth Edition. 2004.
- Swayne D.E., Garcia M., Beck J.R., Kinney N., Suarez D.L. Protection against diverse highly pathogenic avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowl pox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert // Vaccine. 2000. V. 18. P. 1088–1095.

УДК 619:578.832.1:598.2:657.082.26

М.А. Циванок, В.В. Дрыгин

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК MDCK ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ

Введение

Вирус гриппа птиц относится к семейству Orthomyxoviridae, который, в свою очередь, включает в себя вирусы гриппа типа А, В, С [1]. Вирус гриппа типа А разделяют на подтипы по строению поверхностных протеинов: гемагглютинина и нейра-

минидазы. Всего известно 16 гемагглютинирующих и 9 нейраминидазных подтипов, но из 135 пар комбинаций в природе встречаются только 46, и лишь 22–25 из них найдены у птиц [2].

Для диагностики гриппа птиц применяют методы выделения вируса и иден-

тификации его в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реакции нейтрализации (РН) и реакции связывания компонента (РСК). Наиболее распространенным методом является вирусыведение в куриных эмбрионах (КЭ). В качестве патологического материала используют селезенку, головной мозг, синусы, трахеи, легкие, воздухоносные мешки от больной птицы или трупов. Также в качестве материала для выделения могут использоваться назальные и клоакальные смывы [1]. Данный метод подразумевает использование СПФ-эмбрионов, которые подчас недоступны для некоторых птицеводческих хозяйств и региональных лабораторий. Кроме того, данная тест-система высоко чувствительна практически ко всем вирусам птиц, в частности вирусу ньюкаслской болезни (НБ), что затрудняет диагностику гриппа.

В клинических лабораториях Минздрава РФ по рекомендации Всемирной организации здравоохранения уже много лет практикуется выделение изолятов вируса гриппа человека в перевиваемой культуре клеток MDCK. Санкт-Петербургским НИИ гриппа выпускается коммерческий набор для выделения изолятов вируса гриппа человека в культуре клеток MDCK.

Данный метод не уступает по своей эффективности методу выделения в КЭ, к тому же имеет ряд преимуществ: позволяет создать стандартные условия культивирования; кроме того, культура клеток MDCK не чувствительна к большинству вирусов птиц, включая вирус ньюкаслской болезни.

Целью нашей работы являлась разработка метода выделения изолятов вируса гриппа птиц из проб патологического материала в перевиваемой клеточной линии MDCK. Использование данного метода в комплексе вирусологических исследований, в дополнение к выделению вирусов в куриных эмбрионах, позволяет увеличить количество получаемых изолятов.

Также своей задачей мы поставили изучить инфекционные и антигенные свойства одного из выделенных изолятов вируса гриппа птиц подтипа H5N1 после проведения последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток MDCK.

Материалы и методы

Культура клеток. Использовали перевиваемую культуру клеток MDCK – линию клеток почки собаки, полученную Madin и Darby [3]. После предварительного изучения ряда сублиний клеток MDCK, полу-

ченных из различных источников, мы остановились на линии, полученной из НИИ Гриппа (Санкт-Петербург). Клетки пассировали в монослой на среде ПСС с 7% сывороткой крупного рогатого скота (КРС).

Испытуемые материалы. В качестве материала для заражения использовали суспензии из селезенки, головного мозга, трахей, лёгких больной птицы или трупов, полученные путем растирания со стеклянным песком, с добавлением фосфатно-буферного раствора (ФБР) [1].

При заражении использовали бессывороточную среду ПСС с добавлением ТРСК-трипсина «Sigma» (США) до конечной концентрации 2 мкг/мл, а также гентамицина (200 ед./мл) и амфотерицина (2,5 мг/мл).

Перед заражением в среду для выделения вируса вносили суспензию органов в соотношении 1: 9. После перемешивания и освобождения от осадка отстаиванием в течение 15 мин при температуре 4° С, жидкость фильтровали через бактериальные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм.

Работу осуществляли со следующими материалами:

- № 1 — лебедь, органы;
- № 2 — лебедь, органы;
- № 3 — лебедь, органы;
- № 4 — лебедь, органы;
- № 5 — лебедь, органы;
- № 6 — павшие цыплята (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 7 — павшие куры (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 8 — больные цыплята (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 9 — больная курица, органы;
- № 10 — куры (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 11 — куры (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 12 — куры (объединенная проба от 5 голов), органы;
- № 13 — индоутки, петух, индюк, гусь (объединенная проба), органы;
- № 14 — петух, гусь (объединенная проба), органы;
- № 15 — индоутка, органы;
- № 16 — домашняя птица, готовая суспензия органов;
- № 17 — домашняя птица, готовая суспензия органов;
- № 18 — домашняя птица, готовая суспензия органов;
- № 19 — домашняя птица, готовая суспензия органов;

Заражение культуры клеток MDCK.

Пенициллиновые флаконы с монослоем клеток MDCK, выращенном на среде ПСС с 7% сывороткой КРС, отмывали дважды по 1 мл средой (ПСС без сыворотки с ТРСК-трипсином в концентрации 2 мкг/мл) [4]. После этого среду с содержащейся в ней суспензией патматериала добавляли по 2,5 мл в каждый пенициллиновый флакон. Каждую пробу исследовали в четырех повторностях. После этого флаконы инкубировали при температуре 37° С, ежедневно контролируя состояние монослоя. При отсутствии выраженного цитопатического действия (ЦПД) пробы выдерживали при температуре 37° С вплоть до 7 суток [4].

Реакция гемагглютинации (РГА). Начиная с 48 часов после заражения, размножение вируса контролировали в реакции гемагглютинации. С этой целью из каждого флакона отбирали по 50 мкл культуральной жидкости (КЖ), гомологичные пробы объединяли, после чего готовили серийные разведения проб в ФБР. К полученным разведениям КЖ добавляли по 50 мкл трижды отмытых ФБР 1% эритроцитов петуха. При отрицательном результате готовили объединенные пулы культуральной жидкости (из 4 флаконов от каждой пробы) и проводили последующий пассаж с регистрацией репродукции вируса по ЦПД и РГА [4].

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). После вирусыведения пробы, в культуральной жидкости которых обнаружили гемагглютинины или наблюдали выраженное ЦПД, типировали в РТГА. Идентификацию испытуемых проб проводили с набором референтных подтипов специфичных сывороток против вируса гриппа птиц (Институт зоофилактики, г. Венеция, Италия) и сывороткой против вируса ньюкаслской болезни (НБ) (ВНИИЗЖ). РТГА ставили микрометодом по общепринятой методике.

Вирусыведение в КЭ. Испытуемые суспензии инокулировали в 9–10-дневные КЭ (не менее 5 на 1 пробу) в аллантоисную или амниотическую полости общепринятым методом и инкубировали в течение 72 часов. Экстраэмбриональную жидкость каждого эмбриона проверяли в РГА с 1% взвесью эритроцитов петуха. При отсутствии положительной РГА проводили еще 3–5 слепых пассажей [1]. Проба испытуемого материала считалась отрицательной при отсутствии патогенного действия вируса (гибели КЭ) и гемагглютинации.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР).

При исследовании проб патматериала использовали тест-систему «ГРИПП» для выявления вируса гриппа животных и птиц с последующей идентификацией гемагглютинина 5 и 7 типов вируса гриппа А методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) согласно наставлению по применению.

Экспресс-тест для выявления антигена вируса гриппа типа А. В работе использовали «Набор для выявления антигена вируса гриппа типа А» Flu Detect test strip фирмы «Synbiotics» (Франция) согласно инструкции по применению.

Проведение последовательных пассажей изолята вируса гриппа птиц подтипа H5N1 в культуре клеток MDCK. При проведении пассажей так же, как и в случае вирусыведения, использовали бесывороточную среду с добавлением ТРСК-трипсина и антибиотиков. Для заражения брали матрасы емкостью 50 мл с полным монослоем клеток MDCK. Монослой клеток дважды отмывали средой и вносили по 1,5 мл разведенного в той же среде вируса. При заражении делали последовательные десятикратные разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-12} для определения инфекционного титра каждого пассажа. Для улучшения адсорбции оставляли на контакт в течение 1 часа, затем доливали среду до общего объема 15 мл и инкубировали при температуре 37° С, ежедневно контролируя состояние монослоя. При появлении выраженного ЦПД культуральную жидкость исследовали в РГА и использовали в качестве материала для заражения при проведении последующего пассажа. Каждый десятый пассаж культурального вируса типировали в РТГА с набором референтных сывороток против 15 гемагглютинирующих подтипов (Институт зоофилактики, г. Венеция, Италия) и сывороткой против вируса ньюкаслской болезни (НБ) (ВНИИЗЖ), а также определяли инфекционный титр в КЭ.

Результаты и обсуждение

В 12 из 19 исследованных проб патологического материала из неблагополучных по гриппу районов России и стран СНГ наблюдали ЦПД и присутствие гемагглютининов уже в 1 пассаже, в 5 — после проведения второго пассажа, а две пробы были отрицательными. Все пробы после выделения типировали с сыворотками против вируса гриппа типа А к подтипам H5, H7, H9 и вируса ньюкаслской болезни. В 17 пробах был выявлен вирус гриппа птиц и идентифицирован в РТГА как подтип H5.

Изоляция и идентификация вируса из проб патматериала в культуре клеток MDCK и сравнение с другими методами индикации вируса

№ пробы	1 пассаж на культуре MDCK			2 пассаж на культуре MDCK			Вирусовыделение в КЭ	ПЦР	Flu detect test strip*
	Время инкубирования	РГА	Типирование в РТГА (H5)	Время инкубирования	РГА	Типирование в РТГА (H5)			
1	168 ч	-	-	48 ч	1:4	Пол.	Пол.	Пол.	Пол.
2	72 ч	1:4	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
3	72 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
4	168 ч	-	-	48 ч	1:8	Пол.	Пол.	Пол.	Пол.
5	168 ч	-	-	48 ч	1:4	Пол.	Пол.	Пол.	Пол.
6	72 ч	1:16	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
7	48 ч	1:16	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
8	120 ч	-	-	72 ч	1:8	Пол.	Пол.	Пол.	Отр.
9	48 ч	1:16	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
10	72 ч	1:4	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
11	48 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Отр.	Отр.	Отр.
12	48 ч	1:4	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
13	72 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
14	72 ч	-	-	48 ч	1:8	Пол.	Пол.	Пол.	Пол.
15	72 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
16	72 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
17	168 ч	-	-	168 ч	-	-	Пол.	Отр.	Отр.
18	24 ч	1:8	Пол.	-	-	-	Пол.	Пол.	Пол.
19	168 ч	-	-	168 ч	-	-	Пол.	Пол.	Отр.

* — набор для выявления антигена вируса гриппа А фирмы «Synbiotics»

Проба №8 дала отрицательный результат при использовании экспресс-теста для выявления антигена вируса гриппа типа А, при использовании других методов, таких как ПЦР, выделение в КЭ и культуре клеток, в данной пробе был выявлен вирус гриппа. Такое расхождение может объясняться низкой концентрацией вируса в испытуемой суспензии, что формально подтверждается выделением вируса в клетках MDCK лишь во втором пассаже (таблица 1). Из пробы № 11 вирус был выделен только в культуре клеток MDCK, а из пробы № 17 — только в КЭ. Возможно, данное несоответствие с другими методами индикации вируса явилось результатом контаминации. Проба № 19 дала положительный результат лишь в ПЦР и при выделении вируса в КЭ.

Как видно из таблицы 1, вирусывыделение в клетках MDCK демонстрировало сопоставимые результаты по сравнению с изоляцией вируса из проб патматериала в куриных СПФ-эмбрионах. Время, необ-

ходимое для выделения вируса гриппа на культуре и в КЭ, было примерно одинаково и в среднем составляло 48–72 часа. Применение обеих систем культивирования существенно повышает частоту выделения вирусов гриппа.

Результаты вирусывыделения в клеточной культуре MDCK в значительной мере коррелировали с данными ПЦР и экспресс-теста для выявления антигена вируса гриппа типа А.

Как видно из таблицы 2, после проведения 20 пассажей в перевиваемой культуре клеток MDCK все основные характеристики вируса гриппа птиц подтипа H5N1, такие, как гемагглютинирующий титр, инфекционный титр и время инкубации, стали постоянными. После проведения 40 пассажей в культуре MDCK инфекционный титр вируса, при титровании его в КЭ, снизился на 2,5 lg.

Таким образом, в ходе исследований была разработана методика культивирования вируса гриппа птиц в перевиваемой

Проведение последовательных пассажей изолята вируса гриппа подтипа H5N1 в перевиваемой культуре клеток MDCK

№ пассажа	Время инкубации	Титр в РГА	Инфекционный титр (MDCK)	Инфекционный титр (КЭ)
1	72 ч	1:64	10 ^{7,66}	10 ^{9,5}
10	48 ч	1:64	10 ^{6,66}	10 ^{9,5}
20	48 ч	1:128-1:256	10 ^{8,66}	10 ⁸
30	48 ч	1:128-1:256	10 ^{8,5}	10 ^{8,66}
40	48 ч	1:128	10 ^{8,5}	10 ⁷

культуре клеток MDCK, позволившая получить изоляты вируса ГП из проб патологического материала. Эффективность данного метода была подтверждена с помощью результатов, полученных после выделения вируса в КЭ, ПЦР диагностики и

использования экспресс-теста для выявления антигена вируса гриппа типа А. Метод изоляции вирусов в клеточной культуре MDCK расширяет возможности выделения изолятов вируса гриппа птиц, циркулирующих на территории России.

РЕЗЮМЕ

Разработана методика выделения изолятов вируса гриппа птиц из проб патологического материала в перевиваемой культуре клеток MDCK (Madin Darby Canine Kidney). Было исследовано 19 образцов суспензий органов. При анализе результатов, полученных после вирусыведения в клетках MDCK и куриных эмбрионах, наблюдали высокую степень корреляции, данные также хорошо согласовались с результатами ПЦР и экспресс-теста для выявления антигена вируса гриппа типа А. Проведено 40 последовательных пассажей изолята вируса гриппа птиц подтипа H5N1 в перевиваемой культуре клеток MDCK.

SUMMARY

The technique of avian influenza virus isolation from samples of pathological material in the MDCK (Madin Darby canine kidney) cell culture was developed. The nineteen suspensions of organs were investigated. At the analysis of results obtained after virus isolation in MDCK cell culture and embryonated eggs a high scale of correlation was observed, the data also were agreed with the results of PCR and obtained by influenza type A antigen test kit. Forty passages of avian influenza virus isolate were carried out in the MDCK cell culture.

Литература

1. В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев. Вирусные болезни животных. М.: ВНИТИБП, 1998. 928 с.
2. D.E Swayne., M.L. Perdue, M.Garcia et al. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican influenza viruses in chickens // Avian Dis. 1997 V. 41, № 2. P. 335–46.
3. Ю.З Гендон., С.Г. Маркушин, И.И. Аكوпова и др. Дальнейшая разработка культуральной (MDCK) живой холодоадаптированной гриппозной вакцины: культивирование вакцинных штаммов в производственных ферментерах // Вопросы вирусологии, № 2, 2005. С. 4–9.
4. А.А. Соминина, А.О. Монаенков, О.М. Литвинова и др. Выделение вирусов гриппа в клеточной структуре MDCK. СПб., Научно-исследовательский институт гриппа, 1999. 12 с.