

*Нурабаев С.Ш., Матвеева В.М., Кошеметов Ж.К., Нургазиев Р.З.*

**ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ГРИППА ЛОШАДЕЙ В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КУЛЬТУР КЛЕТОК**

*S.Sh.Nurabaev, V.M. Matveeva, Zh.K. Koshemetov, R.Z. Nurgaziev*

**STUDY OF EQUINE INFLUENZA VIRUS REPRODUCTION THE CULTURE OF CELLS TRANSPLANTED LINES**

УДК: 619:616-07/619.3

*Изучена репродукция вируса гриппа лошадей в перевиваемых линиях культур клеток MDCK и VERO с применением в поддерживающей среде трипсин-ЭДТА.*

**Ключевые слова:** *грипп лошадей, культура клеток, штамм, вирус.*

*Studied the reproduction of the virus of influenza in horses transplanted lines of MDCK and VERO cell cultures with a supportive environment in trypsin-EDTA*

**Key words:** *influenza horses, cell culture, the strain of virus*

Грипп лошадей - относится к группе опасных вирусных болезней животных [1].

По клиническим проявлениям инфекция напоминает грипп человека. Хотя случаи гибели животных относительно редки, заболевание может нанести большой экономический ущерб из-за продолжительного периода сниженной активности животных.

Анализ данных по распространению заболевания в странах ближнего и дальнего зарубежья за последние 30 лет свидетельствует о том, что неблагоприятными по данной болезни являются около 50% стран европейского, азиатского и американского континентов [2-4].

В 2007-2008 годах грипп лошадей был зарегистрирован на всех континентах, но особенно крупные эпизоды заболевания была зарегистрированы в Австралии, Монголии, Египте, Российской Федерации, Китае, Кыргызстане.

Расширяющиеся международные отношения способствуют распространению данной инфекции по всему миру. Поэтому предупреждение заноса и распространения возбудителя этой опасной болезни на территории нашей страны является одной из приоритетных задач.

В общем комплексе мероприятий по предупреждению заноса и ликвидации особо опасных вирусных болезней сельскохозяйственных животных существенная роль принадлежит лабораторной диагностике и идентификации возбудителей заболевания. До настоящего времени на территории РК проблеме диагностики гриппа лошадей не уделялось должного внимания, и при возникновении гриппа лошадей в нашей стране ветеринарные и меди-

цинские работники не готовы своевременно поставить диагноз.

Для разработки современных средств и методов диагностики гриппа лошадей необходимо иметь свежесыведенные актуальные штаммы вируса гриппа лошадей и наработать активные вирусосодержащие материалы в чувствительных системах культивирования.

В прошлые годы для этих целей, как правило, использовали куриные эмбрионы, однако изменение тропизма современных вирусов с резким снижением частоты изоляции в них возбудителей гриппа обусловило необходимость широкого лабораторного применения клеточных культур. Одной из таких линий, которая была рекомендована экспертами ВОЗ, является перевиваемая культура клеток, полученная из почек собаки породы спаниель – (MDCK). Широко применяется для культивирования вируса гриппа также и перевиваемая линия культуры клеток почки зеленой мартишки (VERO) [5-9].

Исходя из вышесказанного, целью наших исследований являлось изучение репродукции вируса гриппа лошадей (ВГЛ) в перевиваемых линиях культур клеток MDCK и VERO. В последующем отработанные оптимальные параметры культивирования ВГЛ в культурах клеток будут применены при наработке активной вирусосодержащей культуральной суспензии, пригодной для приготовления диагностических препаратов.

**Материалы и методы**

**Вирус.** В работе использовали штаммы А /лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ. ВГЛ (H7N7) и (H3N8) были выращены в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) согласно установленным регламентам [10]. Инфекционная и гемагглютинирующая активность вируса составляла 7,0 - 7,5 lg ЭИД<sub>50</sub> и 1:512-1024 соответственно.

**Культуры клеток.**

Перевиваемые линии клеток MDCK и Vero, выращенные стационарным способом.

**Реакция гемагглютинации (РГА).** Гемагглютинирующую активность вируса определяли в РГА микрометодом по общепринятому методу [10].

**Результаты и обсуждение**

Изучение репродукции штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ проводили в перевиваемых культурах клеток MDCK и VERO. Для этой цели монослой культур клеток заражали вирусом, контакт длился 1ч при 37°C. После контакта монослоя с вирусом в культуру клеток добавляли питательную среду и выращивали при температуре 37°C, с ежедневным

просмотром под микроскопом до проявления цитопатического действия (ЦПД) вируса. Периодически, через каждые 2-3 дня, начиная с 24-48 часов после заражения, размножение вирусов гриппа контролировали в РГА. Через двое суток меняли поддерживающую среду. В каждой культуре было проведено по три последовательных слепых пассажа. Результаты исследований, проведённых в культурах клеток MDCK и VERO, представлены в табл. 1.

**Таблица №1 - Результаты определения биологической и гемагглютинирующей активности ВГЛ в перевиваемых линиях клеток MDCK и VERO по мере его пассирования**

Номер пассажа	MDCK				Vero			
	штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7)		штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)		Штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7)		штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)	
	Активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА	Активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА	Активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА	Активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА
I	3,5 ± 0,00	10,66±2,66	3,41 ± 0,083	10,66±2,66	3,08±0,012	5,33±1,33	3,33±0,083	3,33±0,66
II	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	-	-	-	-	-	-

Из результатов таблицы 1 видно, что при проведении 3 последовательных пассажей штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемых линий клеток MDCK и VERO отмечено, что биологическая активность данных штаммов в испытанных линиях клеток выявлена только в первом пассаже в титрах 3,08±0,012 - 3,5±0,00 Ig ТЦД50/см<sup>3</sup>, гемагглютинирующая активность была невысокой 1:4-1:16, во втором пассаже обнаружены небольшие деструктивные поражения клеток примерно на 10% площади монослоя.

С целью наработки более активной вирусосодержащей суспензии штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) вируса ГЛ в перевиваемых культурах клеток MDCK и VERO, было испытано применение разных концентраций раствора трипсин-ЭДТА (Т-ЭДТА) в поддерживающей культуральной среде. Для этого в поддерживающую культуральную среду добавляли различные концентрации раствора Т-ЭДТА. Монослой культур клеток в пробирках дважды отмывали культуральной средой, содержащей Т-ЭДТА, заражали вирусом по 0,1мл и вносили по 0,9мл культуральной среды с Т-ЭДТА. Пробирки, инфицированные вирусом, культивировали при температуре 37°C. Состояние монослоя ежедневно контролировали, с целью обнаружения признаков ЦПД вируса. Через каждые 2-3 дня, начиная с 24-48 часов после заражения, размножение вируса гриппа контролировали в реакции гемагглютинации.

В каждой культуре клеток было проведено по три последовательных пассажа. Результаты исследований, проведённых в культуре клеток MDCK, представлены в табл. 2.

**Таблица №2 - Результаты определения биологической и антигенной активности ВГЛ при его пассировании в перевиваемой линии клеток MDCK в среде с Т-ЭДТА**

Номер пассажа	% содержания Т-ЭДТА	штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7)		штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)	
		Биологическая активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА	Биологическая активность, Ig ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА
I	0,1	5,33±0,083	85,33±30,26	6,58±0,083	170,66±42,66
	0,2	5,33±0,083	85,33±30,26	6,58±0,083	213,33±42,66
	0,4	5,33±0,083	85,33±30,26	6,58±0,083	213,33±42,66
II	0,1	4,83±0,083	10,66±2,66	4,83±0,083	21,33±5,33
	0,2	4,83±0,083	21,33±5,33	5,08 ±0,012	10,66±2,66
	0,4	4,83±0,083	21,33±5,33	5,08 ±0,012	10,66±2,66
III	0,1	3,33±0,083	3,33±0,66	3,08±0,012	2,66±0,66
	0,2	3,41 ± 0,083	5,33±1,33	3,33±0,083	3,33±0,66
	0,4	3,41 ± 0,083	5,33±1,33	3,08±0,012	3,33±0,66

Из результатов таблицы 2 видно, что при проведении 3 последовательных пассажей штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемой линии клеток MDCK с добавлением в поддержи-

вающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА отмечено, что наивысшая биологическая и гемагглютинирующая активность данных штаммов выявлена только в первом пассаже 6,58±0,083 Ig ТЦД50/см<sup>3</sup> и 1:128-1:256 для штамма А/лошадь/

Отар/ 764/07 (H3N8),  $5,33 \pm 0,083$  lg ТЦД50/см<sup>3</sup> и 1:64-128 для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7). Во втором и третьем пассажах идет постепенное снижение биологической и гемагглютинирующей

активности данных штаммов до 2,5-3,5 lg ТЦД50/см<sup>3</sup> и 1:2-1:8 соответственно.

Результаты исследований, проведенных в культуре клеток VERO, представлены в табл. 3.

**Таблица №3 - Результаты определения биологической и антигенной активности ВГЛ при его пассировании в перевиваемой линии клеток VERO в среде с Т-ЭДТА**

Номер пассажира	% содержания Т-ЭДТА	штамм А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7)		штамм А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)	
		Биологическая активность, lg ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА	Биологическая активность, lg ТЦД50/см <sup>3</sup>	Титр в РГА
I	0,1	$4,83 \pm 0,083$	$10,66 \pm 2,66$	$5,33 \pm 0,083$	$21,33 \pm 5,33$
	0,2	$4,83 \pm 0,083$	$21,33 \pm 5,33$	$5,33 \pm 0,083$	$21,33 \pm 5,33$
	0,4	$4,83 \pm 0,083$	$10,66 \pm 2,66$	$5,33 \pm 0,083$	$21,33 \pm 5,33$
II	0,1	$3,08 \pm 0,012$	$3,33 \pm 0,66$	$2,33 \pm 0,16$	$3,33 \pm 0,66$
	0,2	$3,41 \pm 0,083$	$5,33 \pm 1,33$	$2,33 \pm 0,16$	$3,33 \pm 0,66$
	0,4	$3,08 \pm 0,012$	$3,33 \pm 0,66$	$2,33 \pm 0,16$	$3,33 \pm 0,66$
III	0,1	-	-	-	-
	0,2	-	-	-	-
	0,4	-	-	-	-

Результаты исследований, представленные в таблице 3 показывают, что мере пассирования штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемой линии клеток VERO, с добавлением в поддерживающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА, отмечено постепенное снижение биологической активности данных штаммов до второго пассажа с  $4,83 \pm 0,083$  до  $3,08 \pm 0,012$  lg ТЦД50/см<sup>3</sup> для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и с  $5,33 \pm 0,083$  до  $2,33 \pm 0,16$  lg ТЦД50/см<sup>3</sup> для штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8), гемагглютинирующая активность данных штаммов снижается с 1:8-1:32 до 1:2-1:4. В третьем пассаже не отмечено ЦПД вируса и его гемагглютинирующей активности.

#### Выводы

Изучение репродукции штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ проводили в культурах клеток MDCK и VERO. Размножение вируса ГЛ в испытанных культурах клеток сопровождалась отчетливой деструкцией монослоя только на 1 пассажном уровне. Во втором пассаже были отмечены небольшие деструктивные поражения клеток на 10% площади монослоя.

Для повышения активности вирусосодержащих суспензий из штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в перевиваемых культурах клеток MDCK и VERO было испытано применение раствора Т-ЭДТА в поддерживающей культуральной среде.

Проведение 3 последовательных пассажей штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемой линии клеток MDCK с добавлением в поддерживающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА показало, что наивысшая биологическая и гемагглютинирующая активность данных штаммов выявлена только в первом пассаже

6,0-6,5 lg ТЦД50/см<sup>3</sup> для штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) и 5,5-6,0 lg ТЦД50/см<sup>3</sup> для штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7). Во втором и третьем пассажах идет постепенное снижение биологической и гемагглютинирующей активности данных штаммов до 2,0-3,5 lg ТЦД50/см<sup>3</sup> и 1:2-1:8 соответственно.

Установлено, что по мере пассирования штаммов А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) и А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8) ВГЛ в монослое перевиваемой линии клеток VERO с добавлением в поддерживающую культуральную среду разных концентраций Т-ЭДТА, как и в культуре MDCK, идет постепенное снижение биологической и гемагглютинирующей активности данных штаммов до второго пассажа, в третьем пассаже не отмечено ЦПД вируса и его гемагглютинирующей активности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что оптимальными условиями получения активного культурального вирусосодержащего материала ГЛ является применение 1 пассажного уровня вируса в культуре клеток MDCK с использованием в поддерживающей среде 0,2% раствора Т-ЭДТА. При этом биологическая активность штамма А/лошадь 1/Киргизия/74 (H7N7) достигает  $5,33 \pm 0,083$  lg ТЦД50/см<sup>3</sup>, а штамма А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)  $6,58 \pm 0,083$  lg ТЦД50/см<sup>3</sup>.

Наработанные активные вирусосодержащие суспензии пригодны для разработки и производства диагностических тест-систем с целью обнаружения и идентификации выделяемых изолятов вируса гриппа лошадей.

#### Литература:

1. Равилов А.З., Сметанин М.А. Грипп сельскохозяйственных животных: Москва, 1989.-С.45-47.
2. Pospisil Z., B. Tumova., L. Ulmann., D. Zendulkova., Epizootics of equine influenza in Chechoslovakia caused by the type A/equi 2 (H3N8), and the effects of

- vaccination// Acta vet. Brno. - 1991. - 60. - № 2. – P. 153-159.
3. *Xawaoka Y., Webster R.C.* Origin of the hemagglutinin on A/Equine/Johannesburg/86 (H3N8): the first known equine influenza outbreak in South Africa //Arch.Virol. - 1989. - 106.-№1-2. -P. 159-164.
  4. *Jacquet A., Cheyroux M., Plateau E.* Surveillance de la grippe equine en France //Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz. - 1987. - 6. - №1.-P. 141-162.
  3. *Tuskova E., Vonka V., Starek M.* Сравнение генетических свойств вирусов гриппа до и после повторных пассажей на культуре клеток почек обезьян// Acta virol. - 1968. - 12. - 4.-316.
  4. *Рейзин Ф. Н., Чумаков М.П., Мартыанова Л.И* Выделение вируса гриппа в клетках МДСК// Вопр. вирусол. - 1985. - №3, - С. 285-287.
  5. *Подчерняева Р. Я., Хижнякова Т. М., Михайлова Г. Р.* и др. Линия клеток Vero(B) для приготовления медико-биологических препаратов // Вопр. вирусол. — 1996. — № 4. — С. 183—185.
  6. *Genzel Y., Olmer R. M., Shafer B., Reiche U.* Ware microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media // Vaccine. — 2006. — Vol. 24. — P. 6074—6087.
  7. *Васильев Ю.М., Руднева И.А., Коптяева И.Б.* Сравнительное изучение размножения вирусов гриппа птиц в культуре клеток и куриных эмбрионах // Вопр. вирусол. - 2009. - №4, - С. 18-23.
  8. *Кыдырбаев Ж.К., Табынов К.К., Рыскельдинова Ш.Ж., Мамадалиев С.М.* Сравнительная оценка параметров культивирования штаммов А/домашний гусь/Павлодар /1/ 05 (H5N1) и А/крячка/Южная Африка/61 (H5N3) вируса гриппа птиц на куриных эмбрионах // Матер. II-й Откр. Всеросс. науч.-практ. конф. молодых учёных //Ульяновская гос. сельскохозяйств. акад. - 2007. - С. 78-83.

**Рецензент: к.вет.н., профессор Кыдырбаев Ж.К.**