

**ВИВЧЕННЯ ГЕМАГЛЮТИНУЮЧИХ І ЦИТОПАТОГЕННИХ
ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕПІЗООТИЧНОГО ШТАМУ ВІРУСУ
ПТАШИНОГО ГРИПУ А/КУРКА/ПРИМОРСЬКИЙ/01/2006/Н5N1
НА ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ КЛІТИН КУРЯЧИХ ФІБРОБЛАСТІВ**

Білявцева О.А., Воротилова Н.Г.

Кримська дослідна станція Національного наукового центру
«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

У статті наведені результати визначення гемаглютинуючої і цитопатогенної дії епізootичного штаму вірусу грипу птиці А/курка/Приморський/01/2006/Н5N1 в первинній культурі клітин курячих фібробластів, яка характеризувалась 100% цитопатогенною дією й руйнуванням моношару через 48 годин інкубації. Гемаглютинуюча активність культуральної рідини при цьому становила 5 log₂. Встановлено, що при інкубуванні інфікованого моношару за температури 33,0°С цитопатогенна дія розвивалася повільніше, ніж за температури 37,5°С.

Починаючи з 50-тих років 20 століття, після відкриття Ендрюсом здатності вірусів поліомієліту розмножуватися в культивованих клітинах тканини ембріона людини, культуру клітин почали потужно впроваджувати не тільки в дослідницьку, але й діагностичну роботу лабораторій медичних закладів. Використанню культури клітин в ветеринарній практиці сприяли такі фактори, як відносно дешева робота з ними, більш ранні строки отримання необхідної інформації щодо збудника, можливість стандартизації досліджень та інші [1,2].

Як відомо, культури клітин розподіляються на первинні, перещеплювані й диплоїдні. З первинних культур більш розповсюджені в ветеринарній практиці первинно-трипсинізовані культури клітин – це клітини, які одержані безпосередньо з органів або тканин організму, які ростуть *in vitro* в один шар [3,4].

Для діагностики та накопичення вірусу пташиного грипу використовують первинно-трипсинізовану культуру клітин з тканин розвиваючих курячих ембріонів [5] та культури перещеплюваних клітин CEF, MDCK, BHK-21 clone 13/04, MDBK, Vero, ЛЕК [6].

Метою нашої роботи було визначити гемаглютинуючі і цитопатогенні властивості епізootичного штаму вірусу пташиного грипу А/курка/Приморський/01/2006/Н5N1 на первинній культурі клітин курячих фібробластів.

Матеріали і методи. Для виготовлення первинної культури курячих фібробластів використовували курячі зародки 9-11 денного віку, тканини яких підлягали трипсинізації, у відповідності із загальноприйнятою методикою (Л.П. Д'яконов та інші, 1980) [7]. Після виготовлення суспензії клітин, додавали живильне середовище 199 з 10 % сироваткою крові великої рогатої худоби, антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин). Підраховували посівну концентрацію клітин у камері Горяєва, яка становила 500 тисяч клітин в 1 см³, висівали підготовлені клітини

у культуральні сосуди ємністю 50 см³ та у пробірки. Моношар клітин первинної культури курячих фібробластів формувався протягом 18–24 годин культивування в термостаті за температури 37,5 °С. Після формування моношару, ростове середовище зливали, моношар клітин відмивали розчином Хенксу.

Інокуляцію культури клітин проводили хоріон-алантоїсною рідиною 6 пасажу епізоотичного штаму А/курка/Приморський/01/2006/Н5N1, із визначенням титру гемаглютинації епізоотичного штаму, який складав 6 log₂. Підготували десятикратні розведення вірусного матеріалу (10⁻¹ – 10⁻¹⁰). Взагалі, культивування проводять при зазначеній множинності інфікування. У якості середнього значення рекомендується застосовувати 10⁶–10⁷ ТЦД₅₀ на 10 млн. клітин [1]. Ми для інокуляції моношару використовували розведення 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸. Кількість хоріон-алантоїсної рідини при інокуляції становила 10% від об'єму поживного середовища. Інкубували за температури 37,5°С протягом 1 години. Після інкубації вірусну рідину зливали і до культури клітин додавали підтримуюче середовище 199 рН 7,2-7,4. Контрольна культура клітин не підлягала інокуляції. Інфіковану культуру клітин інкубували за температури 37,5 °С і 33,0 °С. Цитопатогенну дію (ЦПД) вірусу на моношар контролювали візуально під малим збільшенням мікроскопу двічі на добу. Через 48 та 72 години флакони з культурою клітин піддавали три разовому заморожуванню та розморожуванню (мінус 18 °С – плюс 37,5 °С). Клітинно-культуральну рідину освітлювали центрифугуванням за 1000 обертів/хвилину протягом 15 хвилин. Надсадкову рідину досліджували в реакції гемаглютинації з 1% зависсю еритроцитів півня. Специфічність контролювали у реакції гальмування гемаглютинації з позитивною контрольною сироваткою до вірусу пташиного грипу, отриману виконавцями у попередній роботі [8].

У подальшому проводили інокуляцію 11-денних курячих зародків клітинно-культуральною рідиною на хоріон-алантоїсну оболонку. Інкубували впродовж 48 годин, після чого ембріони розтинали, відбирали хоріон-алантоїсну рідину та визначали титр гемаглютинуючою активності в реакції гемаглютинації з 1% зависсю еритроцитів півня.

Результати дослідження. Чутливість клітин до вірусу пташиного грипу визначали шляхом зараження моношару первинної культури курячих фібробластів на 24 годину росту. Проведено два пасажі в культурі клітин.

Встановлено, що первинно-трипсинізована культура курячих фібробластів є чутливою системою, у якій досліджуваний штам вірусу пташиного грипу репродукував з титром гемаглютинації 5log₂. Цитопатична дія вірусу проявлялася через 24 години й завершувалася через 48 годин за температури 37,5 °С і через 24 години проявлялася й завершувалася через 72 години за температури 33,0 °С.

На початку цитопатогенної дії вірусу характерним було поява осередків округлених клітин у моношарі. Поступово їх кількість збільшувалася, спостерігалось порушення адгезивних властивостей із наступним відокремленням клітин від скла.

За температури 37,5 °С через 24 години інкубації в інокльованому моношарі розведеннями вірусу 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ та 10⁻⁸ спостерігали початок

ЦПД, яка характеризувалася вакуолізацією клітин, при цьому міжклітинні зв'язки були зруйновані, поодинокі клітини сповзали у підтримуюче середовище. За температури 37,5°C через 48 годин інкубації інокульований моношар розведеннями вірусу 10^{-5} та 10^{-6} було зруйновано на 90 %, спостерігали багато загиблих, зморщених клітин. При інокуляції моношару розведеннями вірусу 10^{-7} та 10^{-8} спостерігали руйнування моношару на 100 %.

За температури 33,0°C через 24 години інкубації в інокульованому моношарі розведеннями вірусу 10^{-5} та 10^{-6} цитопатогенної дії не спостерігали. Клітини щільно прилягали одна до одної, були розташовані у вигляді потоків. При інокуляції моношару розведеннями вірусу 10^{-7} та 10^{-8} спостерігався початок цитопатогенної дії, яка характеризувалася появою осередків округлих вакуолізованих клітин в полі зору. Через 48 годин інкубації при інокуляції моношару розведенням вірусу 10^{-5} спостерігали початок ЦПД (на 10 %), вакуолізацію клітин, в полі зору поодинокі зморщені, мертві клітини. При інокуляції моношару розведеннями вірусу 10^{-6} , 10^{-7} та 10^{-8} спостерігали руйнування 50 % моношару клітин, із порушенням міжклітинних зв'язків і загибеллю клітин.

За температури 33,0°C через 72 години інкубації при інокуляції моношару розведенням вірусу 10^{-5} та 10^{-6} спостерігали 90% зруйнованого моношару, в полі зору на склі залишалися поодинокі округлі клітини. При інокуляції розведеннями вірусу 10^{-7} та 10^{-8} моношар був відсутній, всі клітини знаходилися у підтримуючому середовищі.

Таким чином, епізоотичний штам вірусу пташиного грипу А/курка/Приморський/01/2006/H5N1 у розведеннях 10^{-5} – 10^{-8} викликав ЦПД в первинній культурі курячих фібробластів через 24-48 годин інкубації за температури 37,5 °С. ЦПД характеризувалася руйнуванням міжклітинних зв'язків, вакуолізацією клітин, порушенням їх адгезивних властивостей і відокремленням клітин від скла. За температури 33,0°C розвиток цитопатичних змін, спричинених досліджуваним штамом вірусу грипу, був дещо повільнішим, проте, за характером розвитку не відрізнявся від ЦПД за температури 37,5 °С. Через 72 години ЦПД характеризувалася руйнуванням міжклітинних зв'язків, вакуолізацією клітин, порушенням їх адгезивних властивостей і відокремленням від скла. Контрольна культура, яка не підлягала зараженню характеризувалася 100% моношаром веретеноподібних клітин, які розташовувалися потоками. В полі зору не реєстрували зморщених або округлих і вакуолізованих клітин, підтримуюче середовище було прозорим.

При дослідженні культуральної рідини, яку отримали після культивування вірусу за температури 37,5°C, в реакції гемаглютинації з 0,8 % зависю еритроцитів півня титр гемаглютинації становив $5\log_2$, а при дослідженні культуральної рідини, яку отримали після культивування вірусу за температури 33,0 °С не встановлено істотних змін у рівні гемаглютинації ($3-5\log_2$).

Проведено зараження 11-ти денних курячих зародків культуральною рідиною з титром гемаглютинації $5\log_2$. Загибель зародків (100 %) спостерігали через 48 годин інкубації. При дослідженні хоріон-алантоїсної

рідини з 1%-вими еритроцитами півня встановлено граничний титр гемаглютинації $5\log_2$.

Таким чином, за даними проведеної роботи можна зробити наступні висновки:

1. Первинна культура курячих фібробластів є чутливою до штаму вірусу грипу А/курка/Приморський/01/2006/Н5Н1. Цитопатогенна дія епізоотичного штаму вірусу пташиного грипу для культури клітин спостерігалася через 24-48 годин інкубації й характеризувалася 100 % руйнуванням моношару. Титр гемаглютинації вірусотримуючої культуральної рідини становив $5\log_2$.

2. Визначено, що цитопатогенна дія епізоотичного штаму вірусу грипу А/курка/Приморський/01/2006/Н5Н1 за температури інкубації $33,0\text{ }^\circ\text{C}$ була дещо повільнішою й за характером змін у моношарі не відрзнялася від цитопатогенної дії при інкубації моношару за температури $37,5\text{ }^\circ\text{C}$.

3. Репродукований в первинній культурі курячих фібробластів вірус грипу А/курка/Приморський/01/2006/Н5Н1 зберігав високу вірулентність для ембріонів курей й викликав 100 % їх загибель, титр гемаглютинації хоріон-алантоїсної рідини становив $5\log_2$.

Список літератури

1. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине [Текст]: справочное пособие / А.Н. Головкин [и др.]; под общ. ред. А.Н. Головкина. – Х.: «НТМТ», 2007. – 512 с. 2. Феннер, Ф. Биология вирусов животных [Текст]: пер. с англ. В.И.Агола; М.: Мир, 1977. – 450 с. 3. Сюрин, В.Н. Ветеринарна вірусологія [Текст]: /В.Н. Сюрин, Р.В. Білоусова, Н.В. Фоміна. – М.: Колос, 1984. – 376 с. 4. Сергеев, В.А. Репродукция и выращивание вирусов животных [Текст]: /В.А.Сергеев. – М.: Колос, 1976. – 304 с. 5. Високопатогенный грипп птиц [Текст]: монографія / Під ред. Б.Т. Стегнія. – Х.: ТОВ «Повноколір», 2006. – 144 с. 6. Стегній, Б. Вивчення репродуктивних властивостей штаму А/курка/Сиваш/02/05/(Н5Н1) вірусу грипу птиці [Текст] /Б.Т. Стегній [та ін.] // Міжвід. тем. зб. «Ветеринарна медицина». – Харків.- 2004.- вип.№84.- С.206-211. 7. Методические рекомендации по изготовлению и использованию питательных сред и растворов для микробиологических целей, культивирования клеток и вирусов [Текст] /Дьяконов Л.П., А.Ф.Конюхов, Е.Н.Василевич и др. М.: 1988, 68 с. 8. Патент на корисну модель №31027. «Спосіб отримання позитивної контрольної сироватки до вірусу грипу птиці Н5Н1» [Текст] / О.А. Белявцева [та ін.]; КДС ННЦ «ІЕКВМ». – заявлено 29.10.07., опубл. 25.03.08, – Бюл. №6.

STUDIES OF HEMAGGLUTININ AND VIRULENT PROPERTIES OF EPIZOOTIC ISOLATES OF THE VIRUS AVIAN INFLUENZA STRAIN A/CHICKEN/PRIMORSKY/01/2006/H5N1 ON THE PRIMARY CULTURE OF CELLS OF CHICKEN FIBROBLASTS

Bilyavceva E.A., Vorotilova N.G.

Crimean Research Station of the National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine»

Results at studies of virulent and hemagglutinin action of epizootic isolates of the virus avian influenza A/Chicken/Primorsky/01/2006/H5N1 in the primary culture of cells of chicken fibroblasts, which was characterized 100 % by a cytopathogenic action and destruction of monolayer in a 48 hours of incubation are presented in the article. Hemagglutinin activity of cultures liquid made $5\log_2$. It has been established that at incubation of infected monolayer at the temperature of $33\text{ }^\circ\text{C}$ a cytopathogenic action developed more slowly than at the temperature of $37,5\text{ }^\circ\text{C}$.