

УДК 619:578.832.1:619.5

Б. Т. СТЕГНІЙ, доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України¹

К. Ф. МАЙОРОВА¹

Д. В. МУЗИКА, кандидат ветеринарних наук¹

О. Ф. БЛОЦЬКА, кандидат ветеринарних наук²

Л. І. АКІМЕНКО, кандидат біологічних наук²

А. П. ГЕРІЛОВИЧ, доктор ветеринарних наук¹

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

²ДНКІБШМ, м. Київ

ДЕПОНУВАННЯ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ВІРУСУ ГРИПУ А ПІДТИПІВ Н1-Н14

У статті наведені результати депонування виробничих штамів вірусу грипу А підтипів Н1-Н14. Представлені данні щодо перевірки біологічних та молекулярно-генетичних властивостей, відсутності контамінації вірусів сторонньою мікрофлорою (вірусами, бактеріями, грибами, мікоплазмами). За результатами проведених досліджень показана відповідність усіх біологічних властивостей 14 штамів вірусу грипу А паспортним даним та можливість використання цих вірусів для виробництва біопрепаратів.

Ключові слова: штами вірусу грипу, біологічні та молекулярно-генетичні властивості.

На сьогодні важко прогнозувати, до яких ще епідеміологічних наслідків можуть привести спалахи грипу птиці [1]. Найбільш небезпечними можуть виявитися нові пандемічні віруси грипу, які можуть з'явитися в наслідок реасортації генів вірусів грипу людини і птахів. Усі віруси, що викликали усі відомі пандемії грипу людини в ХХ сторіччі мали частину генів, що отримали від вірусу грипу птиці. Епідемічні віруси регулярно проникають в популяції домашніх і диких тварин та птиці, так само як і з дикої природи відбувається постійна інтродукція вірусів, насамперед у популяції домашніх птахів, а також свиней. За певних ситуацій такий реасортант може перетворитися на вірус, який може блискавично поширитися в світі і забрати десятки, а то й сотні мільйонів людських життів [2]. Ці дані свідчать про необхідність постійного контролю циркуляції вірусів грипу як в популяціях свійських тварин та птиці так і диких. Все це потребує наявності сучасних діагностичних тест-систем.

Складна епізоотична ситуація в світі, зокрема і в Україні щодо грипу птиці в останні декілька років, а також недостатня кількість зареєстрованих вітчизняних засобів специфічної діагностики цього захворювання, спонукали нас до розробки вітчизняної діагностичної тест-системи грипу птиці в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Реакція затримки гемаглютинації – це «золотий стандарт» в діагностиці захворювань, що викликаються гемаглютинуючими вірусами. За чутливістю вона не поступається сучасним методам, а за специфічністю значно перевищує усі відомі, тому Міжнародне епізоотичне бюро рекомендує для проведення серологічної діагностики грипу птиці використовувати реакцію затримки гемаглютинації. Протягом декількох років в ННЦ «ІЕКВМ» проводилася робота

щодо створення вітчизняної діагностичної тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птахів в реакції затримки гемаглютинації. Першим етапом цієї роботи було проведення депонування виробничих штамів вірусу грипу, що є обов'язковим при проведенні процедури реєстрації препарату [3]. Ця робота була проведена спільно з фахівцями Держаного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів.

Матеріали і методи.

В роботі було використані наступні еталонні штами вірусу грипу А підтипів H1-H14 (таблиця 1).

Таблиця 1

Еталонні штами вірусу грипу А

Антигенна формула	Назва штаму
H1N1	А/свиня/Айова/15/30
H2N2	А/Сингапур/1/57
H3N8	А/качка/Україна/63
H4N6	А/качка/Чехословаччина/56
H5N3	А/крячок/Південна Африка/61
H6N2	А/індик/Масачусетс/65
H7N7	А/курка/Росія/87
H8N4	А/індик/Онтаріо/67
H9N2	А/індик/Вісконсин/66
H10N7	А/курка/Німеччина/Н/49
H11N6	А/качка/Англія/56
H12N5	А/качка/Альберта/60/70
H13N2	А/мартин/Астрахань/1421/79
H14N2	А/мартин/Астрахань/227/84

В роботі були використані референтні сироватки крові виробництва Національної та МЕБ Референс-лабораторії грипу та ньюкаслської хвороби Інституту Зоопротекції (National, OIE and FAO Reference Laboratory of Avian Influenza and Newcastle Disease Institute Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie) м. Падуа, Італія (таблиця 2).

Таблиця 2

Референтні сироватки крові

Найменування сироватки крові	Найменування штаму вірусу
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H1N1 subtype	A/sw/It/558/86
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H2N3 subtype	A/Dk/Germ/1215/73
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H3N8 subtype	A/Psitt/It/2873/00
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H4N8 subtype	A/Cockatoo/Eng/72
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H5N3 subtype	A/duck/It/775/04
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H6N2 subtype	A/TY/Canada/65
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H7N3 subtype	A/ty/It/9289/V02

Reference antiserum against Avian Influenza, type A H8N4 subtype	A/turk/ONT/6118/68
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H9N7 subtype	A/turk/Scotland/1/70
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H10N1 subtype	A/Ostrich/SA/01
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H11N9 subtype	A/Duck/ Memphis/546/174
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H12N5 subtype	A/Duck/Alberta/60/76
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H13N6 subtype	A/Gull/Maryland/704/77
Reference antiserum against Avian Influenza, type A H14N5 subtype	A/Mallard/Gurjev/263/82

Перевірка відповідності біологічних властивостей виробничих штамів вірусу грипу паспортним даним проводилася згідно з методикою про депонування за наступними показниками: зовнішній вигляд та умови зберігання; гемаглютинаційна активність штамів вірусів; належність штамів до вірусу грипу А; відсутність контамінації вірусів грипу А сторонніми вірусами; належність штамів до підтипів Н1-Н14 вірусу грипу А. Реакцію гемаглютинації (РГА) та реакцію затримки гемаглютинації (РЗГА) з 1% суспензією еритроцитів півня ставили згідно з рекомендаціями МЕБ [4]. Належність штамів до вірусів грипу А та відсутності контамінації сторонніми мікроорганізмами перевіряли в поєднанні з ланцюговою реакцією (ПЛР). Дослідження проводились на базі лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Ізоляцію вірусної РНК проводили за допомогою комерційного набору «РИБО-сорб-50» виробництва ФГУН Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, Москва, Російська Федерація. Виділені зразки РНК було використано для напрацювання кДНК, як матрицю. Реакція зворотної транскрипції проведена за допомогою набору «РЕВЕРТА-Л» виробництва ФГУН Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, Москва, Російська Федерація. Реакцію ампліфікації проводили за допомогою базових реагентів для проведення ПЛР виробництва ФГУН Центральний науково-дослідний інститут епідеміології, Москва, Російська Федерація. У роботі використано праймери на вірус грипу А – AivA_M, вірус ньюкаслської хвороби – NDV Fusion, вірус інфекційного бронхіту – S1 (розробка – ННЦ «ІЕКВМ», синтез – Sigma-Aldrich Ltd.), вірус синдрому зниження несучості – 76 - EDS76, вірус інфекційного ларинготрахеїту – ILTV, вірус хвороби Гамборо – IBDV, мікоплазми - Muc23S (Mollicutes). Електрофоретичний аналіз проводили за допомогою набору для електрофорезу виробництва ТОВ «Амплісенс», Москва, Російська Федерація. Концентрація агарози в гелі 1,5 %, сила струму 120 В.

Результати досліджень.

Визначення зовнішнього вигляду. Визначення зовнішнього вигляду, кольору проводили візуально. За результатами досліджень встановлено, що віруси грипу А підтипів Н1-Н14 мають вигляд прозорої рідини світло-жовтого або жовто-рожевого кольору. Зберігаються за температури мінус 75⁰С. Усі кріопробірки мали відповідне маркування, де було вказано: назву вірусу, назву штаму, біологічну активність, дату отримання.

Визначення біологічної активності вірусів грипу А. Біологічну активність вірусів визначали в РГА з 1% суспензією еритроцитів півня. Результати представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Результати визначення гемаглютинуючої активності вірусів грипу А

Антигенна формула	Назва штаму	Титр в РГА
H1N1	А/свиня/Айова/15/30	1:512
H2N2	А/Сингапур/1/57	1:256
H3N8	А/качка/Україна/63	1:256
H4N6	А/качка/Чехословаччина/56	1:128
H5N3	А/крячок/Південна Африка/61	1:128
H6N2	А/індик/Масачусетс/65	1:1024
H7N7	А/курка/Росія/87	1:256
H8N4	А/індик/Онтаріо/67	1:256
H9N2	А/індик/Вісконсин/66	1:256
H10N7	А/курка/Німеччина/Н/49	1:1024
H11N6	А/качка/Англія/56	1:256
H12N5	А/качка/Альберта/60/70	1:128
H13N2	А/мартин/Астрахань/1421/79	1:256
H14N2	А/мартин/Астрахань/227/84	1:64

Таким чином було встановлено, що усі досліджені виробничі штами вірусу грипу А є активними та викликають аглютинацію еритроцитів півня в титрах від 1:64 до 1:1024.

Визначення належності штамів до вірусу грипу А та відсутності контамінації сторонніми вірусами проводили за допомоги ПЛР. За проведеною експертизою встановлено, що проби № 1-14, що відповідають вірусам грипу підтипів H1-H14 є аутентичними, тобто містять РНК вірусу грипу А (рис. 1). При дослідженні цих проб з праймерами NDV Fusion, S1, EDS76, ILTV, IBDV, Мус23S реакція пройшла без утворення продукту, що свідчить про відсутність контамінації цих проб вірусами ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту курей, синдрому зниження несучості-76, інфекційного ларинготрахеїту, хвороби Гамборо, а також мікоплазмами.



Рис. 1 Вивчення аутентичності вірусів грипу А (H1-H14).

Проби № 1-14 - віруси грипу А підтипів H1-H14, проба 15 – вірус ньюкаслської хвороби (контроль), «K-» - негативний контроль на грип А, «K+» - позитивний контроль на грип А.

Визначення належності штамів до підтипів Н1-Н14 вірусу грипу А проводили в РЗГА з референтними сироватками крові. Результати представлені в таблиці 4.

З таблиці 4 видно, що усі віруси грипу А специфічно реагують з гомологічними референтними сироватками в титрах від 1:64 до 1:1024. Незначні перехресні реакції в титрах 1:8 – 1:16 виявлено між вірусами Н3, Н6, Н9, а також Н12, Н13, Н14. Це є нормальним явищем в зв'язку з тим, що усі віруси грипу А є спорідненими між собою та між ними можуть спостерігатися перехресні реакції в титрах до 1:32. Крім того віруси підтипів Н3, Н6, Н9 раніше відносилися до одного підтипу при старій класифікації. Специфічним вважається найвищий титр, а при наявності перехресних реакцій він повинен перевищувати усі інші в 2 та більше разів.

Таблиця 4.

Визначення належності штамів до підтипів Н1-Н14 вірусу грипу А в РЗГА з референтними сироватками крові.

Референтні сироватки	Штами вірусу грипу А													
	Н1А/св./Айова/15/30	Н2А/Син/1/57	Н3А/кач/Україна/63	Н4А/кач/Чех/56	Н5А/крячок/Пів. Африка/61	Н6 А/індик/Мас/65	Н7А/курка/Росія/87	Н8А/індик/Онгла/67	Н9А/індик/Віск/66	Н10А/курка/Нім/49	Н11А/кач/Англія/56	Н12А/кач/Аль/60/70	Н13А/мар/Аст/1421/79	Н14А/мар/Аст/227/84
	Титр специфічних антитіл													
Н1	1:256													
Н2		1:256												
Н3			1:256			1:16			1:8					
Н4				1:128										
Н5					1:64									
Н6			1:16			1:512			1:16					
Н7							1:1024							
Н8								1:1024						
Н9			1:16			1:8			1:64					
Н10										1:256				
Н11											1:512			
Н12												1:64		1:8
Н13													1:512	
Н14													1:8	1:256

Висновок: Таким чином за результатами досліджень виробничих штамів вірусу грипу А підтипів Н1-Н14 встановлено, що усі штамів вірусу грипу А мали відповідний зовнішній вигляд та умови зберігання; викликали аглютинацію еритроцитів півня в титрах від 1:64 до 1:1024; належали до вірусів грипу типу А, були вільними від контамінації сторонніми вірусами (нюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту, синдрому зниження несучості-76, хвороби Гамборо) та мікоплазмами. Кожний штам вірусу грипу А специфічно та найбільш активно реагував з референтною сироваткою відповідного підтипу. Нами встановлено, що основні біологічні властивості штамів А/свиня/Айова/15/30, А/Сингапур/1/57, А/качка/Україна/63, А/качка/Чехословаччина/56, А/крячок/Південна Африка/61, А/індик/Масачусетс/65,

А/курка/Росія/87, А/індик/Онтаріо/67, А/індик/Вісконсин/66, А/курка/Німеччина/Н/49, А/качка/Англія/56, А/качка/Альберта/60/70, А/мартин/Астрахань/1421/79, А/мартин/Астрахань/227/84 відповідали паспортним даним та за результатами досліджень ці віруси депоновано в Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів за номерами 452-465, відповідно.

1. Маркин В. А., Махлай А. Л., Воробьева М. С., Бектимиров Т. А. Коллекционирование патогенных вирусов: состояние и перспективы проблемы [Текст] // Вопросы вирусологии. №6. – М., 1996 – С. 281 -284.

2. Львов Д.К. Значение вновь возвращающихся инфекций в биобезопасности [Текст] // Вопросы вирусологии. № 5. - М., 2002 – С. 4 -7.

3. Бабкін М.В., Бузун А., Стегній Б.Т., Герілович А.П. Депонування штаму «А(курка)Сиваш/02/05(Н5N1)» вірусу пташиного грипу [Текст] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. № 87. – Х., 2006 – С. 31-34.

4. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines / Office International desepisootic (OIE), 2004. (Посібник з стандартизації діагностичних тестів та вакцин).

ДЕПОНИРОВАНИЕ ШТАММОВ ВИРУСА ГИППА А ПОДТИПОВ Н1-Н14 /
Б.Т. Стегний, К.Ф. Майорова, Д.В. Музыка, О.Ф. Блоцкая,
Л.И. Акименко, А.П. Герілович

В статье приведены результаты депонирования производственных штаммов вируса гриппа А подтипов Н1-Н14. Представлены данные о проверке некоторых биологических и молекулярно-генетических свойств, отсутствие контаминации вирусов посторонней микрофлорой (вирусами, бактериями, грибами, микоплазмами). По результатам проведенных исследований показана соответствие всех биологических свойств 14 штаммов вируса гриппа А паспортным данным и возможность использования этих вирусов для производства биопрепаратов.

Ключевые слова: штаммы вируса гриппа, биологические и молекулярно-генетические свойства.

DEPOSIT STRAINS OF INFLUENZA A VIRUS SUBTYPES H1-H14 / В.Т. Stegny, K.F. Mayorova, D.V. Muzyka, O.F. Blotska, L.I. Akimenko, A.P. Gerilovych.

The results of the deposit of industrial strains of influenza A virus subtypes H1-H14. The data on the inspection of biological and molecular properties, the absence of contamination with extraneous microflora (viruses, bacteria, fungi, mycoplasma). The results of the studies demonstrated compliance with all of the biological properties of 14 strains of influenza A virus passport data and the use of these viruses for the production of biologics.

Keywords: strains of influenza, biological and molecular properties.

Рецензент – доктор ветеринарних наук В. О. Ушкалов.