

УДК 619:578.835.1

РЕПЛИКАЦИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА УТЯТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Трефилов Б.Б., Леонов И.К., Никитина Н.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства», Санкт-Петербург, e-mail: vnivip@yandex.ru

Зависимость между rct – признаком вируса и другими генетическими маркерами, в частности, патогенностью, составляет в настоящее время сущность теоретического обоснования применения метода пассажей в культуре клеток при неоптимальных температурах для получения вирусных препаратов с измененными биологическими свойствами. Изучение и разработка критериев и методов контроля аттенуированных штаммов, используемых для производства биопрепаратов, является актуальным. В статье показана способность к репликации вакцинных штаммов ВГНКИ-К и 3М-УНИИП вируса гепатита утят и их динамика накопления в различных клеточных культурах (куриные и утиные фибробласты, клетки почки и печени утиных эмбрионов). Установлен различный индекс чувствительности клеточных культур к штаммам вируса. Показана возможность культивирования производственных вакцинных штаммов вируса гепатита утят при пониженной и повышенной температурах. Штаммы ВГНКИ-К и 3М-УНИИП характеризовались как $rct^{TC_{32^\circ} \pm}$, $rct^{TC_{40^\circ} +}$ и $rct^{TC_{32^\circ} +}$, $rct^{TC_{40^\circ} +}$ соответственно.

Ключевые слова: вирус гепатита утят, культура клеток, репликация, пассажи, температура.

REPLICATION OF THE VIRUS OF DUCK HEPATITIS AT DIFFERENT TEMPERATURES

Trefilov B.B., Leonov I.K., Nikitina N.V.

Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science», Saint-Petersburg, e-mail: vnivip@yandex.ru

The relationship between the rct- sign of virus and the genetic markers, in particular, pathogenicity is at the present time the essence of theoretical justification of the method of passages in cell culture at sub-optimal temperatures to obtain viral preparations with modified biological properties. The study and development of criteria and methods of control of attenuated strains, used for the production of biological products, is relevant. The article shows the capability of duck hepatitis virus vaccine strains VGNKI-K and 3M-UNIP to replicate and their dynamics of accumulation in different cell cultures (chicken and duck fibroblasts, kidney and liver cells of the duck embryos). Detected different sensitivity index of cell cultures to virus strains. Analysis possibility of cultivation of production vaccine strains of duck hepatitis virus at low and high temperatures. The VGNKI-K and 3M-UNIP are characterized as $rct^{TC_{32^\circ} \pm}$, $rct^{TC_{40^\circ} +}$ and $rct^{TC_{32^\circ} +}$, $rct^{TC_{40^\circ} +}$ respectively.

Keywords: ducklings hepatitis virus, cell culture, replication, passages, temperature.

Вирусный гепатит утят (ВГУ) – высоко контагиозная, остро протекающая среди утят и латентно среди уток болезнь, с преимущественным поражением печени. Эта болезнь до настоящего времени имеет широкое распространение в утководческих хозяйствах промышленного типа и сопровождается высокой смертностью утят 1-30 – суточного возраста, достигая до 30–95 % [4,5,17].

Вирус гепатита утят типа I относится к семейству Picarnoviridae роду Avihepatovirus [14,16].

Вирус удается культивировать на первичных клетках печени и почки эмбрионов уток и гусей [1,6], а также на фибробластах утинового и куриного эмбрионов с коллагеназой [1,7,8].

Метод тканевых культур находит все большее применение в генетических

исследованиях с вирусами животных и человека. С его помощью изучен целый ряд важных генетических признаков вирусов: цитопатогенная, бляшкообразующая, интерферогенная активность, чувствительность к экзогенному интерферону, способность к репликации при различных температурах и другие.

Способность вирусов к репродукции и способность вызывать цитопатогенное действие в клеточных культурах, а также их репликация при различных температурах культивирования являются наследственными биологическими признаками.

Работами ряда исследователей показана возможность изменения наследственных свойств вирусов путем пассажей в культуре клеток при пониженной и повышенной температурах. Усиленное применение этого метода оказалось тесно связано с глубоким изучением способности вирусов к репликации при определенной температуре, так называемого *gct* – признака.

Доказано, что *gct* – маркер вирусов является наследственным свойством и даже отдельные штаммы одного вируса обладают не одинаковым *gct* – признаком [3,9, 11,12,15].

Зависимость между *gct* – признаком и патогенностью составляет в настоящее время сущность теоретического обоснования применения метода пассажей у культуре клеток при неоптимальных температурах для получения вирусных вакцин с измененными биологическими свойствами [13,15].

Учитывая, что в литературе слабо освещен вопрос о способности вируса гепатита утят к репликации в тех или иных видах тканевых культурах и отсутствие данных по культивированию вируса при различных температурах, целью наших исследований явилось изучение способности вакцинных штаммов вируса гепатита утят к репликации в культурах клеток при различных температурах культивирования (ТС и *gct* – маркеры).

Материалы и методы исследований

Вирус. В работе использовали производственные вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят, культивируемые в культуре утиных фибробластов при температуре 37 ° С, и хранили при минус 20 ° С.

Культуры клеток: культура фибробластов 10–12 — суточных куриных эмбрионов (ФЭК); культура фибробластов 14–15 – суточных утиных эмбрионов (ФЭУ); культура клеток печени 25–27 – суточных утиных эмбрионов; культура клеток почки 25–27 – суточных утиных эмбрионов.

Первично-трипсинизированную культуру клеток готовили из кожно-мышечной ткани, печени и почек куриных и утиных эмбрионов по методике Dulbecco R.&Vogt M. (1954) в модификации Younger J.S. (1954) [10].

В качестве питательной ростовой среды использовали среду Игла MEM/DMEM и

среду 199 в соотношении 2:1 с добавлением 10 % нормальной сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиков: бензилпенициллина 100 ЕД/см³ и стрептомицина сульфата — 100 мкг/см³. Раствор для диспергирования ткани состоял из 0,25 % раствора трипсина, 0,02 % раствора версена и раствора Хенкса в соотношении 1:2:2. Трипсинизацию проводили на магнитной мешалке при температуре 36–37 °С в течение 10–15 мин до полного расщепления фрагментов ткани на отдельные клетки. По истечении указанного времени клеточную взвесь сливали во флаконы с охлажденной смесью сыворотки крови крупного рогатого скота до 10 % и среды Игла (соотношение 1:1) с целью нейтрализации действия трипсина.

Суспензию клеток центрифугировали при 900–1000 об/мин в течение 20 мин. Из осадка после ресуспензирования готовили суспензию клеток в питательной ростовой среде с содержанием 650–750 тыс. кл./см³. Клеточную суспензию разливали в пробирки и матрасы по 2 и 220 см³ соответственно и инкубировали в стационарных условиях при температуре (37,0±0,5)°С. В течение 48 часов на поверхности стекла формировался клеточный монослой.

Определение Rct^{TC} признака. Способность вакцинных штаммов к репликации при неоптимальных температурах изучали путем 5-кратного пассирования в культуре фибробластов утиных эмбрионов. Культивирование зараженных и контрольных клеток проводили при температурах 32 и 40 °С, учитывая время наступления и характер ЦПД в культуре клеток. Инфицирование ФЭУ проводили в дозе 1,0 ЦПД₅₀ на клетку. После 1, 3 и 5-го пассажа определяли инфекционный титр вируса методом титрования и выражали в lg ТЦД₅₀/см³.

Rct^{TC} признак штаммов вируса, определяли по методу М. Беньеш-Мельник и Дж.Л. Мельник (1961) [2], в основе которого лежит вычисление разности между титрами изучаемых штаммов вируса при 37 и 32 °С или 37 и 40 °С. Так, rct_{32}^- / rct_{40}^- – разница титров вируса больше 4 lg ТЦД₅₀/см³; rct_{32}^+ / rct_{40}^+ – разница титров вируса меньше 2 lg ТЦД₅₀/см³; $rct_{32}^{0\pm} / rct_{40}^{0\pm}$ – разница титров вируса от 2,1 до 4 lg ТЦД₅₀/см³.

Титрование вируса на культуре клеток по цитопатогенному действию (ЦПД) проводили в культурах клеток методом десятикратных разведений и с соответствующими контролями.

Величину титра вычисляли по методу Reed L.J. & Muench H. (1938) [10] и выражали в lg ТЦД₅₀ в 1.0 см³ (тканевая цитопатогенная доза).

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методам.

Результаты исследований и обсуждение

Вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят вызывали острую форму вирусной инфекции в культурах клеток куриных и утиных эмбрионов при температурах культивирования 32, 37 и 40 °С. Цитопатогенное действие сопровождалось

округлением клеток на ограниченных участках монослоя, появлением симпластических образований с зернистостью в цитоплазме клеток через 72–96 часов после инокуляции, а на последней стадии репликации вируса формированием синцития и дегенерацией клеточного монослоя через 96–120 часов культивирования. Латентная фаза штамма ВГНКИ-К при температуре 37 °С составила 24 часов и 48 часов штамма ЗМ-УНИИП, а при температуре 32 и 40 °С она равнялась у штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП 72 и 48 часам соответственно. Данные определения активности штаммов в различных первично-трипсинизированных культурах клеток при температуре 37 °С представлены в табл. 1.

Таблица 1

Биологическая активность вакцинных штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят в культурах клеток при 37 °С

Штамм вируса	Активность штаммов, lg ТЦД ₅₀ , M±m*			
	Культура клеток			
	ФЭК	ФЭУ	почки	печени
			утиного эмбриона	
ВГНКИ-К	3,75 ± 0,5	5,66 ± 0,3	6,00 ± 0,1	6,67 ± 0,25
ЗМ- УНИИП	3,25± 0,15	4,6± 0,25	5,00± 0,2	5,25± 0,3

Примечание: M ± m – среднее значение титров штамма вируса.

Результаты исследований показали, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят способны к репликации в фибробластах куриных и утиных эмбрионов и в культуре клеток почки и печени утиного эмбриона, вызывая в них цитопатогенное действие различной интенсивности. Установлено, что культуры клеток утиных эмбрионов были более чувствительны к штаммам вируса по сравнению с культурой фибробластов куриных эмбрионов. Активность штамма ВГНКИ-К вируса гепатита утят была выше в культурах утиного эмбриона 1-1,5 lg ТЦД₅₀ по сравнению с активностью штамма ЗМ-УНИИП.

В процессе изучения культуральных свойств штаммов вируса гепатита утят была определена чувствительность различных первичных клеточных культур относительно клеток печени утиных эмбрионов, которую выражали в индексе чувствительности (И) и вычисляли по формуле: $I = T/P$, где T – обратная величина конечного разведения вируса, при котором ЦПД регистрируется в 50 % пробирок с испытуемым монослоем; P – обратная величина конечного разведения вируса, при котором ЦПД регистрируется в 50 % пробирок с культурой клеток печени. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Чувствительность клеточных культур к вакцинным штаммам вируса гепатита утят

		ТЦД ₅₀ 37° - lgТЦД ₅₀ 32°	ма по rct _{32°}		ма по rct _{37°}		ТЦД ₅₀ 37° - lgТЦД ₅₀ 40°	rct _{40°}
ВГНКИ- К	3,00±0,5	2,75±0,3	±	5,75±0,2	+	4,00±0,2	1,75±0,1	+
ЗМ- УНИИП	2,75±0,3	1,92±0,1	+	4,67±0,3	+	3,2±0,6	1,47±0,3	+

Суммируя полученные результаты, следует отметить, что вакцинные штаммы ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят различались по способности к репликации при пониженной температуре и характеризовались как rct^{TC}_{32°±} и rct^{TC}_{32°+} штаммы соответственно. Индексы подавления репликации их при температуре 32° С равнялись 2,75±0,3 и 1,92±0,1 lg ТЦД₅₀. В то время как при температуре 40° С степень репликации штаммов была выше и характеризовались как rct^{TC}_{40°+} штаммы, их индексы подавления были 1,75±0,1 и 1,47±0,3 lg ТЦД₅₀. Различия в цитопатогенной активности вакцинных штаммов вируса гепатита были выявлены при культивировании их в условиях пониженной температуры.

Выводы

Показана способность штаммов ВГНКИ-К и ЗМ-УНИИП вируса гепатита утят к репликации в первичных культурах клеток (ТС-признак). Штамм ВГНКИ-К характеризуется как TC^{che±}, TC_{de}[±], TC_N^{de+}, TC_H^{de+}, а ЗМ-УНИИП – как TC^{che±}, TC_{de}⁺, TC_N^{de+}, TC_H^{de+} штаммы вируса.

Вакцинные штаммы вируса гепатита утят отличаются по rct^{TC}_{32°} – маркеру и аналогичны по rct^{TC}_{40°} – признаку.

Изученные маркеры свидетельствуют о слабой аттенуации вакцинных штаммов вируса гепатита утят и возможной их реверсии в процессе пассирования при производстве вакцин.

Список литературы

1. Белицкая Л.А. Выращивание вируса гепатита утят в тканевых культурах/ Л.А. Белицкая // Сб. работ молодых ученых ВНИИП. – 1964. – Вып. 7. – С. 18-19.
2. Беньеш-Мельник М.Б. Маркирующие признаки вируса полиомиелита и их отношение к вирулентности штаммов вируса для обезьян / М. Беньеш-Мельник, Дж. Мельник // Полиомиелитная пероральная живая вакцина. – М., 1961. – С.210-223.
3. Бочкарев В.С. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов метапневмовируса птиц: автореф. дис... канд. вет. наук/ В.С. Бочкарев. – СПб., 2013. – 22 с.
4. Князев В.П. Некоторые аспекты диагностики, лечения и специфической профилактики

вирусных инфекций уток: монография / В.П. Князев, О.В. Белорыбкина, С.Р. Кременчугская, Т.А. Фомина. – Владимир, 2003. – 60с.

5. Князев В.П. Болезни водоплавающих птиц: монография/ В.П. Князев. – Владимир, 2010. – 160с.

6. Майборода А.Д. Действие вируса гепатита утят на клетки тканевых культур почек цыплят и утиных эмбрионов/А.Д. Майборода // Ветеринария. – 1965. – № 8. – С. 28.

7. Майборода А.Д. Формирование вируса гепатита уток в культуре клеток/А.Д. Майборода // Ветеринария. – 1972. – № 8. – С. 50.

8. Паникар И.И. Вирусный гепатит утят и его профилактика / И.И. Паникар. – М. Россельхозиздат, 1987. – 63с.

9. Сарбаева Н.В. Сравнительная характеристика вакцинного и эпизоотических штаммов реовируса теносиновита кур: автореф. дис. ... канд. биол. наук/ Н.В. Сарбаева. – М., 1997. – 23с.

10. Сюрин В.Н. Ветеринарная вирусология / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. – М.: Агропромиздат, 1991. – С.376.

11. Трефилов Б.Б. Сравнительное изучение генетических признаков вакцинных штаммов вируса инфекционного ларинготрахеит птиц: автореф. дис... канд. биол. наук / Б.Б. Трефилов. – Тарту, 1972. – 27с.

12. Трефилов Б.Б. Разработка и внедрение средств диагностики и специфической профилактики наиболее опасных вирусных болезней птиц (инфекционный ларинготрахеит, вирусный энтерит гусей, реовирусный теносиновит): автореф. дис... д-ра вет. наук/ Б.Б. Трефилов. – СПб., 2000. – 42с.

13. Heide L. Development of an attenuated apatogenic reovirus vaccine against viral arthritig / tenosynovitis// L. Heide, M. Kalbac, M. Brustolon. Av. Dis, 1985. – Vol.27. – No. 3. – P. 689-706.

14. Jin X. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei Province of China/ X. Jin, W. Zhang, W. Zhang [et al.]// Res. Vet. Sci., 2008. – V. 85. – P. 595-598.

15. Patnayak D.P. Cold-adapted avian pneumovirus of use as live, attenuated vaccine in turkeys / D.P.Patnayak, B.R.Gulati, M.A.Sheikh [et al.] // Vaccine. – 2003. – V.21. – P.1371-1374.

16. Tseng C.H. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus/ C.H.Tseng, N.J. Knowles, H.J. Tsai // Virus Res., 2007. – V. 123. – P. 190-203.

17. Woolcock P.R. Duck hepatitis/ P.R. Woolcock , Y.M. Saif, A.M. Fadly [et al.] // In: Diseases of Poultry 12th Edition, 2008. – P. 373-384.

Рецензенты:

Бакулин В.А., д.вет.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», г. Санкт-Петербург;

Разбицкий В.М., д.вет.н., старший научный сотрудник отдела паразитологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства», г. Санкт-Петербург – Ломоносов.