

ПОЛУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ К ПОДТИПАМ ВИРУСА ГРИППА ТИПА А

**Исмагамбетов Б.М., Кошеметов Ж.К., Богданова М.И., Наханова Г.Д.,
Нурбаев С.Ш., Сейсенбаева М.С., Сансызбай А.Р., Касенов М.М.**

*Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности
РГП НИИПББ КН МОН, Гвардейский, e-mail: Koshemetov2008@mail.ru*

В данной статье представлены результаты очистки и концентрирования штаммов вируса гриппа типа А. Метод осаждения и очистки вируса гриппа типа А с помощью ПЭГ-6000 с последующим ультрацентрифугированием и осветлением дает возможность получить активный и концентрированный препарат вируса гриппа типа А, при этом гемагглютинирующая активность в РГА составляла 1:2560–2048000, содержание белка 390–1130 мкг/мл. Для разрушения вириона ВГА опытным путем был подобран реагент тритон X-100, в последующем для очистки HA+NA ВГА были использованы ультрацентрифугирование в течение 5 часов при 250000 g через 25% сахарозы. Далее для очистки HA от NA ВГА в опыте использованы формалинизированный эритроцит петуха, и активность HA в РГА при этом составила 1:128–1:2048. Для получения антисыворотки к HA ВГА использованы кролики и козы. Активность антисывороток к HA, полученных на кроликах, составила в РТГА 1:256–1:16368, а козьих антисывороток – 1:256–1:4096.

Ключевые слова: вирус гриппа типа А, гемагглютинин, белок, очистка, концентрирование, антисыворотка

OBTAINING OF DIAGNOSTICAL PREPARATIONS TO SUBTYPES OF INFLUENZA VIRUS TYPE A

**Ismagambetov B.M., Koshemetov Zh.K., Bogdanova M.I., Nakhanova G.D.,
Nurabaev S.Sh., Seysenbaeva M.S., Sansyzbay A.R., Kasenov M.M.**

*Research Institute for Biological Safety Problems RSE RIBSP SC MES RK,
Gvardeiskiy, e-mail: koshemetov2008@mail.ru*

Results of purification and concentration of strains of influenza virus type A are presented in this article. Method of precipitation and purification of influenza virus type A with use PEG-6000 with following ultracentrifugation and clarification gives the chance to obtain the active and concentrated preparation of influenza virus type A. At the same time, hemagglutinating activity in hemagglutination-inhibition reaction (HAIR) was 1:2560-2048000 and protein content of 390-1130 µg/ml. Reagent Tryton X-100 was selected for virion destruction of influenza virus type A, for purification HA+NA were used ultracentrifugation for 5 hours at 250000 g of 25% sucrose. Then, for purification HA from NA of influenza virus type A are used formulated erythrocyte of cock, HA activity in HAIT was 1:128-1:2048. Rabbits and goats are used for obtaining antisera to HA of influenza virus type A. Antisera activity to HA obtained on rabbits was 1:256-1:16368 in HAIT and in goats antisera – 1:256-1:4096.

Keywords: influenza virus type A, hemagglutinin, protein, purification, concentration, antiserum

Вирус гриппа типа А (ВГА) является одним из важнейших инфекционных агентов человека и животных. Столь высокий потенциал ВГА связан с их быстрой эволюцией, в результате чего может повысить свою патогенность по отношению к птице и приобрести эпидемическую опасность [1]. Возбудителем болезни является ВГА семейства ортомиксовирусов, имеющих подтиповые варианты, которые устанавливаются двумя наружными белками – гемагглютинином (Н1-Н16) и нейраминидазой (N1-N10). Гемагглютинин и нейраминидаза являются факторами агрессии вируса гриппа. Интенсивность интоксикации при гриппе определяется свойствами гемагглютинина, а нейраминидаза обладает выраженным иммунодепрессивным действием. Оба поверхностных антигена характеризуются выраженной способностью к изменчивости, в результате чего появляются новые анти-

генные варианты вируса. Гемагглютинины 1, 2, 3-го типов и нейраминидазы 1, 2-го типов содержат вирусы, которые поражают человека. Другие антигены характерны для вирусов гриппа животных (свиней, собак, лошадей, многих видов птиц и др.) [2].

Эффективная борьба с ВГА невозможна без своевременной и достоверной серологической диагностики, а также проведения постоянного диагностического мониторинга эпизоотической обстановки, которые являются первоочередными задачами медицинской и ветеринарной служб.

Основная роль в диагностике и профилактике вирусных заболеваний принадлежит специфическим сывороточным препаратам, получаемым от различных животных – продуцентов [3]. Экспериментально доказано, что большое значение в получении активных и специфических антисывороток имеют неспецифические стимуляторы антитело-

образования или адьюванты, а также доза и пути введения антигена [4].

В связи с этим получение высокоактивных и специфических диагностических препаратов к ВГА актуально в том плане, что появится возможность своевременного, высокоэффективного и точного типирования ВГА на территории Республики Казахстан.

Цель исследования

Выделение НА подтипов ВГА и на их основе получение диагностических препаратов.

Материалы и методы исследования

Вирус: В работе использовали штаммы А/утка/Альберта/35/76 (H1N1), А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), А/утка/Германия/215/73 (H2N3), А/чирок свиштунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8), А/малая поганка/Алаколь/791/04 (H4N6), А/домашний гусь /Павлодар/1/05(H5N1), А/duch/Singapore-Q/F-119-2/97 (H5N3), А/turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2), А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) и А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6) ВГА, которые находятся в лаборатории «Коллекция микроорганизмов» РГП НИИПББ КН МОН РК. Данные штаммы были выращены в РКЭ согласно установленным регламентам [5].

Животные. В качестве доноров противогриппозных антител к подтипам ВГА служили кролики и козы местной породы в возрасте до одного года. Использование высокоспецифичных антисывороток, полученных от этих животных, рекомендовано Экспертным комитетом ВОЗ для уверенного антигенного субтипирования НА и НА ВГА, так как они дают самые минимальные неспецифические реакции [6].

Очистка суспензий ВГА. Вирусосодержащую суспензию ВГА осветляли центрифугированием при 3000 об/мин, затем рН доводили до 8,5, и с целью концентрирования к суспензии добавляли ПЭГ-6000 до конечной концентрации 7% и оставляли в течение 24 ч при 4°C. Далее вирус осаждали центрифугированием при 5000 г в течение 1 ч. Затем вирус подвергали ультрацентрифугированию при 106000 г в течение 2 ч. Осадок вируса гомогенизировали и осветляли при 5000 г в течение 10 мин. Вирус при необходимости, очищали в градиенте плотности (20–60%) сахарозы. Очищенный вирус ресуспендировали в 100-кратном объеме стерильного 0,05 М фосфатно-буферного раствора с рН 7,2–7,4.

Выделение НА+НА ВГА. Очищенные препараты ВГА разрушали тритоном в конечной концентрации 0,5% в течение ночи при 4°C. Для выделения фракции НА + НА, разрушенный вирус наслаивали на 25% сахарозу и центрифугировали 1,5 часа при 250000 г при 4°C. Верхний слой, над сахарозой, согласно методике, содержал фракцию очищенных поверхностных белков вируса гриппа (НА – НА). Далее фракцию НА – НА диализовали в течение 3 суток против 0,01М ФБС. Очищенный препарат должен содержать только НА – НА.

Разделение НА от НА. Очистку НА от НА проводили с помощью адсорбции на формализированных эритроцитах петуха в течение 10–15 мин при 4°C. Элюция НА с эритроцитов осуществлялась теплым физиологическим раствором в течение 4–6 ч при 37°C.

Получение антисывороток. Схема гипериммунизации кроликов состояла из 3 введений НА в возрастающей дозе (512, 1024 и 2048 ГАЕ/кг) в область надколенных лимфоузлов задних ног с интервалом между введениями в 1 неделю в комплексе с адьювантом ISA-71, в соотношении 1:1. За неделю до начала цикла гипериммунизации кроликам вводили, в область надколенных лимфоузлов задних ног по 0,5 мл НА+НА.

Схема гипериммунизации коз также состояла из 3 введений НА, в возрастающей дозе (512,1024,2048 ГАЕ/кг) в область предлопаточных лимфоузлов с интервалом между введениями в 1 неделю в комплексе с сапонином (2–3 введение). За 21 день до начала цикла гипериммунизации козам вводили НА в дозе 256 ГАЕ/кг массы тела.

Постановка РГА и РТГА. Гемагглютинирующую активность вируса определяли в РГА микрометодом по общепринятому методу [5].

Реакцию РТГА проводили микрометодом в 96-луночных планшетах фирмы «Costar» (США) согласно рекомендациям МЭБ [5].

Содержание белка определяли по методу Lowry [7], используя в качестве стандарта БСА фирмы «Sigma» (США).

Результаты исследования и их обсуждение

Как известно, препаративное выделение высокоочищенных антигенов вируса гриппа является одним из важнейших этапов получения диагностических иммунореагентов. Для очистки вируса из вирусосодержащих суспензий нами был применен широко используемый метод осаждения и очистки вируса гриппа с помощью ПЭГ-6000 с последующим ультрацентрифугированием и осветлением. Результаты концентрирования белка и активности в РГА очищенных подтипов ВГА представлены на рис. 1 и 2.

Очищенный вирус представлял собой гомогенный препарат, гемагглютинирующая активность составляла 1:2560–2048000, при исходной активности вируса 1:512–1:1024, содержание белка 390–1130 мкг/мл. Очищенные препараты были использованы для выделения гемагглютинина и нейрамидазы.

Выделение гемагглютинина и нейрамидазы в чистом виде связано с определёнными трудностями. Оба антигена являются гликопротеидами и прикрепляются к липидной оболочке вируса последовательно гидрофобных аминокислот.

Для снятия с поверхности вириона гликопротеинов ортомиксовирусов обычно используют большой спектр реагентов. Чаще других неионные детергенты Тритон X-100, NP-40, Твин-20, эфир, ионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН), а также бромелайн и n-октилглюкозид (октилглюкопиранозид, 1-O-n-octyl-β-d-glucopyranoside) [8].

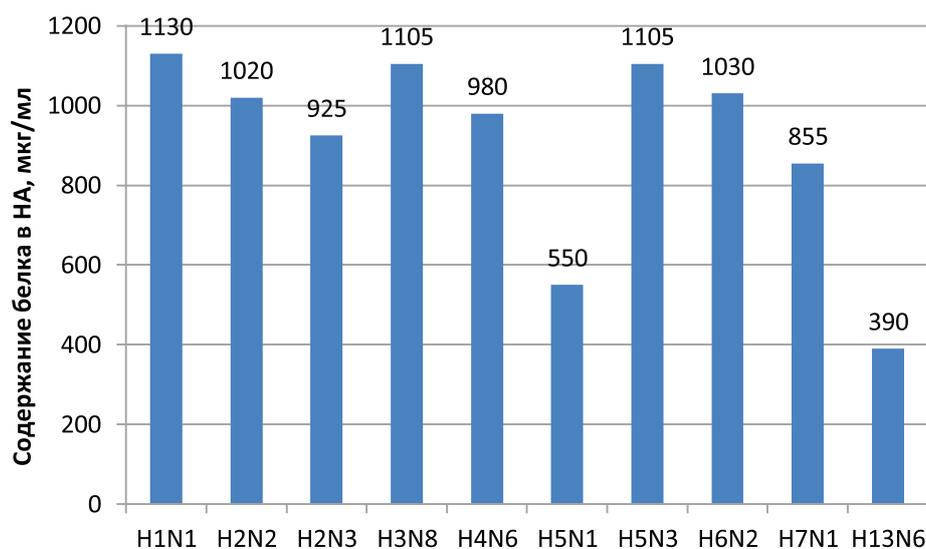


Рис. 1. Концентрация белков подтипов ВГА

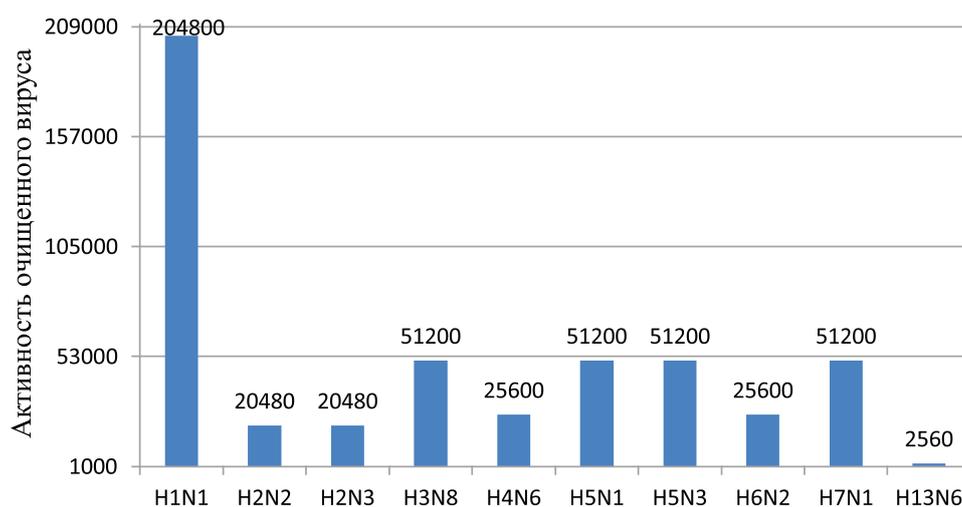


Рис. 2. Активность очищенных препаратов подтипов ВГА в РГА

В результате проведенных исследований было установлено, что оптимальным реагентом для получения чистого препарата НА ВГА оказался тритон X-100.

Активность очищенных препаратов ВГА исследовали в РГА. Результаты представлены на рис. 3.

В результате очищенные препараты НА ВГА показали высокую гемагглютинирующую активность в РГА – с 1:128 до 1:2048. Очищенные препараты (НА) в дальнейшем были использованы для получения специфических сывороток к НА Н1, Н2, Н3, Н4, Н5, Н6, Н7 и Н13 ВГА на козах и кроликах.

В практике чаще всего применяют введение возрастающих доз антигена с интервалами в 4–5 и более дней. Способствует повышению иммунологической реактивности продуцентов гипериммунизация [4].

Через 7 суток после последней инъекции у коз и кроликов брали пробу крови и проводили контроль активности антителообразования в РТГА (рис. 4).

Как видно из рис. 4, активность антисывороток к НА, полученных на кроликах, составила в РТГА 1:256-1:16368, активность козьих антисывороток составила в РТГА 1:256-1:4096.

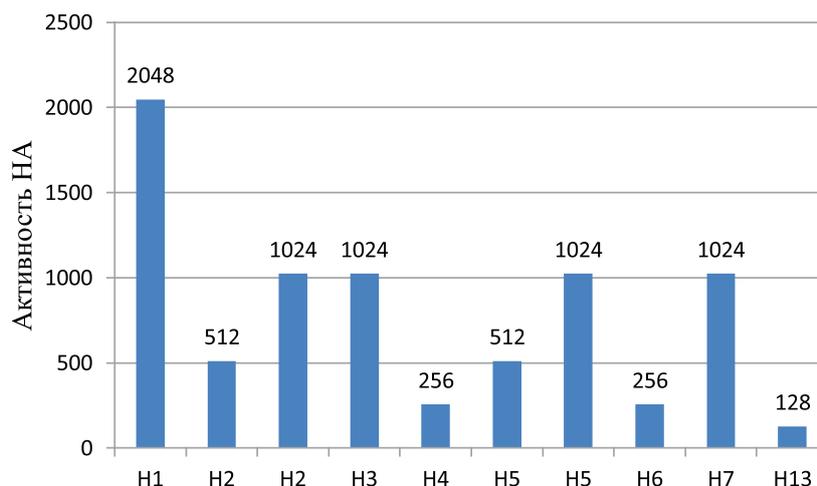


Рис. 3. Активность HA подтипов ВГА в РГА

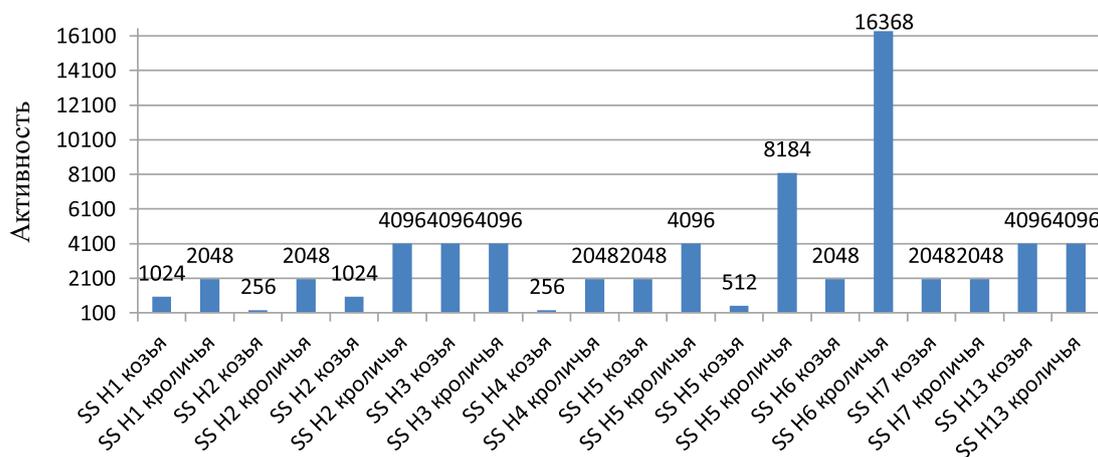


Рис. 4. Активность антисывороток к HA подтипов ВГА в РТГА

Полученные антисыворотки к HA H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 и H13 ВГА на козах и кроликах были проверены на специфичность и чувствительность методами ИФА (набор ФГБУ «ВНИИЗЖ») и РТГА (набор ОАО «Покровский завод биопрепаратов»). В результате опыта приготовленные препараты оказались пригодными для ИФА и РТГА для диагностики ВГА.

Закключение

В результате проведенных исследований, из концентрированных и очищенных препаратов штаммов ВГА А/утка/Альберта/35/76 (H1N1), А/серебристая чайка/Атырау/2186/07 (H2N2), А/утка/Германия/215/73 (H2N3), А/чирок свистунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8), А/малая по-

ганка/Алаколь/791/04 (H4N6), А/домашний гусь /Павлодар/1/05(H5N1), А/duch/Singapore-Q/F-119-2/97 (H5N3), А/turkey/Massachusetts/3740/65 (H6N2), А/цыпленок/Росток/29 (H7N1) и А/черноголовый хохотун/Атырау/284/02 (H13N6) вируса гриппа типа А были выделены и очищены гемагглютинин, и на основе HA были получены активные и специфичные сыворотки на козах и кроликах. Полученные препараты были апробированы методами ИФА (ФГБУ «ВНИИЗЖ») и РТГА (ОАО «Покровский завод биопрепаратов»).

Приготовленные препараты могут быть использованы в диагностических тест-системах (РТГА и ИФА) с целью типирования вируса гриппа типа А и для определения напряженности иммунитета.

Список литературы

1. Easterday B.C., Hinshaw V.S., Halvorson D.A. Influenza. Iowa State University Press, Ames, 1997. – P. 583–605.
2. Swayne De. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens / De. Swayne, M.L. Perdye, M. Garcia, E. Rivera-Cruz, M. Brugh // *Avian Dis.* – 1997. – № 41(2). – P. 335–346.
3. Лашкевич В.А. Использование моноклональных антител в вирусологии // *Вопр. вирусол.* – 1983. – № 5. – С. 648–655.
4. Murphy K. Appendix 1: Immunologists Toolbox / K. Murphy, P. Travers, M. Walport // *Janeway's Immunobiology*. 7th edition. – Garland Science, 2008. – 735 p.
5. Старов С.К. Справка по методам диагностики высокопатогенного вируса гриппа птиц // *БИО.* – август 2006. – С. 13–15.
6. OIE, Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). – 5th ed. – Paris, 2004. – Vol. 1–2.
7. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // *J. biol. Chem.* – 1951. – v. 193. – P. 265–275.
8. Лузянина Т.Я. Антигенный профиль нейраминидазы вирусов гриппа А, выделенных в 1957–73 гг. / Т.Я. Лузянина, Д.Е. Голубев, Н.А. Иванова // *Acta virologica.* – 1974. – Т. 18, Вып. 6. – G 479485.