

УДК619:578.831.3

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ МЕТАПНЕВМОВИРУСА ПТИЦ

Трефилов Б.Б., Никитина Н.В., Бочкарев В.С., Борисова М.С.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства,
Санкт-Петербург, e-mail: vnivip@yandex.ru

Вирулентные и аттенуированные штаммы метапневмовируса (МПВ) птиц различаются по ряду генетических признаков, тщательное их изучение приобрело особое значение для отбора природно-ослабленных и вакцинных штаммов, используемых для специфической профилактики болезни. Проведено изучение генетических маркеров производственных вакцинных штаммов 8544 и VC-03 МПВ птиц, связанных с особенностями их внутриклеточной репликации и выявляемых *in vitro*. Показано, что штаммы вируса индуцировали острую форму вирусной инфекции в первичных культурах клеток с различным латентным периодом в зависимости от вида культуры. Максимальное их накопление обнаружено в клетках Vero с посевной концентрацией 2×10^5 кл/см³ при инокуляции монослоя через 48–72 ч и времени съема вируса через 72 ч после заражения. Подтверждена возможность использования трахеальной органной культуры для выделения и изучения маркеров МПВ птиц. Установлена способность штаммов 8544 и VC-03 к репликации в клетках Vero при температурах 34 и 40 °С и к индукции интерферона, концентрация которого была в прямой зависимости от множественности штамма-индуктора. Штаммы вируса чувствительны к действию экзогенного интерферона.

Ключевые слова: вакцинные штаммы метапневмовируса птиц, генетические маркеры, культуры клеток, репликация, интерферон

GENETIC MARKERS OF VACCINE STRAINS OF AVIAN METAPNEUMOVIRUS

Trefilov B.B., Nikitina N.V., Bochkarev V.S., Borisova M.S.

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

Virulent and attenuated strains of avian metapneumovirus (aMPV) distinguished by a number of genetic signs, thorough study acquired a special meaning for selection of natural-attenuated and vaccine strains that used for the specific prophylaxis of disease. It has been conducted the study of genetic markers of the production strains 8544 and VC-03 aMPV, are associated with features of their replication and identified *in vitro*. It has been showed, that the strains of the virus are induced the acute form of virus infection in the primary cell cultures with different latent period depending on the type of culture. Their maximal accumulation was found in Vero cells with sowing concentration 2×10^5 cells/cm³ by inoculation of monolayer after 48–72 hours and the time of virus removal after 72 hours after the inoculation. It has been confirmed the possibility of using the tracheal organ culture for the isolation and study of aMPV markers. It has been installed the ability of strains 8544 and VC-03 to the replication in Vero cells by 34 and 40 °C and induction of interferon, which concentration was in direct dependency of strain-inductor multiplicity. Strains of virus are susceptible to the effect of exogenous interferon.

Keywords: vaccine strains of avian metapneumovirus, genetic signs, cell cultures, replication, interferon

Метапневмовирусы, как и другие биологические объекты, обладают свойствами, передаваемыми по наследству. Наряду со свойствами, общими для всех вирусов, имеются признаки, которые могут быть выражены в разной степени у вариантов одного и того же вируса. Эти свойства, играющие основную роль в дифференциации штаммов (вирусов), носят название генетических признаков.

Так как генетические признаки являются отражением особенностей вирусного генома, изменение их может служить показателем эффективности различных экспериментальных воздействий на генетический материал вируса, включая химический и физический мутагенез.

Установлено, что вирулентные и аттенуированные штаммы вируса могут различаться по ряду генетических признаков, тщательное их изучение приобрело особое

значение для отбора природно-ослабленных и искусственно полученных вакцинных вариантов.

Усовершенствование имеющихся методов контроля и научно-практическая разработка новых методов контроля вакцинных штаммов метапневмовируса птиц в процессе изготовления и применения вакцин против этой болезни, как и других биопрепаратов, должно складываться из следующих основных направлений:

а) применение современных методов оценки производственных штаммов, характеризующих их иммунобиологические особенности – детальная проверка генетических признаков, их вариабельности в организме и в культурах клеток;

б) применение высокочувствительных и стабильных клеточных культур, не содержащих контаминирующих агентов для контролей производственных штаммов и вакцин;

в) использование иммунных типоспецифических сывороток (не гипериммунных и не гамма-глобулинов) для типирования производственных штаммов и эталонов для контроля иммуногенной и антигенной активности производственных серий вакцин.

Целью настоящей работы явилось изучение генетических маркеров вакцинных штаммов метапневмовируса птиц, связанных с особенностями их внутриклеточной репликации и выявляемых *in vitro*.

Материалы и методы исследований

При выполнении работы использовали вакцинные штаммы 8544 подтипа А (G.P Wilding et al., 1986) [8] и VC-03 подтипа В (Y.P. Picault et al., 1987) [7] МПВ птиц, культивируемые в клетках Vero.

Эксперименты ставили на первично-трипсинизированных культурах фибробластов СПФ эмбрионов кур (ФЭК), эмбрионов гусей (ФЭГ), трахеальной органной культуре (ТОК) куриных эмбрионов, перевиваемой линии клеток Vero (институт гриппа АМН, Санкт-Петербург).

Культивирование культур клеток проводили с использованием питательных сред Игла MEM и/или ДМЕМ и № 199, растворов версена 0,02%, Хенкса фирмы «Nuclone, раствора трипсина 0,25% фирмы «US BIO производства ООО «Биолот, Санкт-Петербург, сыворотки крови крупного рогатого скота и плодов коровы.

Приготовление культуры клеток, титрование вируса по цитопатогенному действию, изучение маркеров штаммов проводили по методам, описанным в руководстве по вирусологии [3].

Способность штаммов вируса к репликации в культуре клеток при различных температурах определяли по методу М. Бенеш-Мельник, Дж. Л. Мельник (1961) [1], в основе которого лежит вычисление разности между титрами штаммов вируса при температуре 37 и 34 °С или 37 и 40 °С.

Результаты исследований и их обсуждение

Репликация вакцинных штаммов 8544 и VC-03 МПВ птиц в культуре ФЭК со-

провождалась цитопатическим эффектом с первого пассажа, и этот феномен обнаруживался через 48–72 часа после инокуляции клеток. В культуре ФЭУ и ФЭГ штаммы вируса адаптировались со 2–3 пассажа. Штаммы 8544 и VC-03 индуцировали острую форму вирусной инфекции в первичных культурах различным латентным периодом в зависимости от вида культуры клеток.

Характер цитопатогенного действия (ЦПД) выражался в округлении клеток с зернистостью в цитоплазме на ограниченных участках монослоя через 48–72 часа. На 4–5 сутки инкубации зернистость наступала по всему монослою. Полную дегенерацию и гибель ФЭК отмечали на 6–7 сутки и 8–9 сутки ФЭУ и ФЭГ после инфицирования с образованием разной величины синцитиальных формаций.

Данные, приведенные в табл. 1, показали, что в культуре ФЭК вакцинные штаммы 8544 и VC-03 накапливались в 5-ом пассаже в титрах $5,25 \pm 0,2$ и $5,75 \pm 0,1$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно. В культурах ФЭУ титры были $2,75 \pm 0,3$ и $3,1 \pm 0,3$ lg ТЦД₅₀/см³ и ФЭГ – $3,0 \pm 0,2$ и $3,7 \pm 0,1$ lg ТЦД₅₀/см³.

Данные, представленные в табл. 2, показали, что вакцинные штаммы 8544 и VC-03 имели максимальное накопление $6,25 \pm 0,1$ и $6,75 \pm 0,1$ lg ТЦД₅₀/см³ соответственно, в клетках Vero с посевной концентрацией 2×10^5 кл/см³ при инокуляции монослоя через 48–72 ч и времени съема вируса через 72 ч после заражения.

При микроскопическом изучении клеток Vero, инфицированных вакцинными штаммами МПВ птиц, отмечали характерные аналогичные цитопатические изменения в монослое и структуре клеток через различные сроки после инокуляции.

Таблица 1

Инфекционные титры вакцинных штаммов МПВ птиц в первично-трипсинизированных культурах клеток (n = 5)

Наименование культур клеток	Штамм вируса	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , M ± m*		
		Число пассажей		
		1	3	5
ФЭК	8544	$5,2 \pm 0,1$	$5,33 \pm 0,15^*$	$5,25 \pm 0,2$
	VC-03	$5,75 \pm 0,2$	$5,66 \pm 0,2$	$5,75 \pm 0,1$
ФЭУ	8544	$1,75 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,15$	$2,75 \pm 0,3$
	VC-03	$2,5 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$
ФЭГ	8544	$1,66 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,25$	$3,0 \pm 0,2$
	VC-03	$2,75 \pm 0,1$	$2,75 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$

Таблица 2

Влияние посевной концентрации клеток Vero, их возраста и времени съема вируса на его величину инфекционного титра в клетках Vero (n = 3)

Время съема вируса, ч	Возраст клеток Vero, ч	Множественность заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Концентрация клеток, тыс/см ³	Титр инфекционности вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , M ± m*	
				8544	VC-03
24	48–72	0,5	200	3,5 ± 0,1*	3,75 ± 0,2
48	48–72	0,5	200	6,1 ± 0,3	6,5 ± 0,2
72	48–72	0,5	200	6,25 ± 0,1	6,75 ± 0,1
96	48–72	0,5	200	6,0 ± 0,3	6,5 ± 0,4

Системой, выбранной для выделения и изучения биологических свойств МПВ птиц, является ТОК [4, 5].

В опытах для получения ТОК использовали 18-суточные СПФ эмбрионы кур. При культивировании вакцинных штаммов 8544 и VC-03 МПВ птиц в ТОК установлено, что штаммы вызывали незначительное снижение активности ресничек слизистой на 3–5% и 7% соответственно. Степень репликации штаммов вируса в клетках эпителия определяли методом титрования в клетках Vero.

Таблица 3

Титры инфекционности вакцинных штаммов МПВ в трахеальной органной культуре

Штаммы вируса	Титры вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ , M ± m*		
	Число пассажей		
	1	2	3
8544	5,1 ± 0,2*	5,3 ± 0,33	5,33 ± 0,15
VC-03	5,4 ± 0,3	5,5 ± 0,25	5,55 ± 0,15

Данные, приведенные в табл. 3, показали, что штаммы 8544 и VC-03 вируса накапливались в ТОК в титрах 5,33 ± 0,15 и 5,55 ± 0,15 lg ТЦД₅₀/см³ соответственно.

В процессе изучения культуральных свойств штаммов МПВ птиц была определена чувствительность различных клеточных культур к испытуемым штаммам относительно клеток Vero, которые выражали в индексе чувствительности. По чувствительности клеточные культуры расположились в следующем порядке: ФЭК, ТОК, ФЭГ и ФЭУ.

Результаты исследования по изучению культуральных маркеров вакцинных штаммов 8544 и VC-03 свидетельствуют о том, что способность их к репликации в клеточных культурах различна и подтверждается данными других авторов [2, 6].

Способность вакцинных штаммов МПВ к репликации при температурах 34, 37 и 40 °C изучали в клетках Vero в процессе пяти пассажей (Rct^{TC} – признак).

Полученные данные, представленные в табл. 4, показали, что штаммы вируса вызывали ЦПД в клетках Vero и накапливались при неоптимальных температурах культивирования в высоких титрах: штамм 8544 – 5,5 ± 0,2 lg ТЦД₅₀, штамм VC-03 – 6,5 ± 0,25 lg ТЦД₅₀ при 34 °C и при 400 °C 5,8 ± 0,15 lg ТЦД₅₀, 6,5 ± 0,05 lg ТЦД₅₀ соответственно. Они характеризовались как rct^{TC+} штаммы.

Таблица 4

Способность вакцинных штаммов МПВ к репликации при различных температурах и определение rct^{TC} признака

Штамм вируса	Инфекционный титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ (M ± m)*							
	Температура культивирования							
	Rct _{34°} 5пассаж	Индекс подавления репликации вируса lg ТЦД ₅₀ 37°–lg ТЦД ₅₀ 34°***	Характеристика штамма по rct _{35°}	Rct _{37°}	Характеристика штамма по rct _{37°}	Rct _{40°} 5пассаж	Индекс подавления репликации вируса lg ТЦД ₅₀ 37°–lg ТЦД ₅₀ 40°***	Характеристика штамма по rct _{40°}
8544	5,5 ± 0,2*	0,75 ± 0,01	+	6,25 ± 0,2	+	5,8 ± 0,15	0,45 ± 0,01	+
VC-03	6,5 ± 0,45	0,25 ± 0,05	+	6,75 ± 0,5	+	6,5 ± 0,5	0,25 ± 0,05	+

Примечание. * M ± m, ** разница в титрах вируса при 37 и 34 °C (37 и 40 °C).

Способность вакцинных штаммов МПВ птиц к индукции интерферона изучали в клетках Vero множественностью заражения 0,01; 0,1 и 1,0 ТЦД₅₀ на клетку. Данные опытов свидетельствовали, что концентрация интерферона в культуральной жидкости была в прямой зависимости штаммов-индукторов и времени отбора проб после инокуляции клеток Vero. Наибольшую активность интерферона отмечали через 72–96 часов культивирования.

Штаммы 8544 и VC-03 существенно не отличались по интерферогенной активности и по чувствительности к гомологичному эндогенному интерферону и характеризовались как If⁺ и sIf⁺ штаммы.

Список литературы

1. Беньеш-Мельник М.Б., Дж. Мельник. Маркирующие признаки вируса полиомиелита и их отношение к вирулентности штаммов вируса для обезьян / В сб.: «Полиомиелитная пероральная живая вакцина» – М., 1961. – С. 210–223.
2. Борисова И.А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против Ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: дисс... канд. биол. наук. – Владимир, 2008. – 167 с.
3. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. – М.: «Колос», 2000. – 272 с.
4. McDougall J.S. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations / J.S. McDougal, J.K.A. Cook // *Vet. Rec.* – 1986. – Vol. 118. – P. 206–207.
5. Naylor C. J. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. / C.J. Naylor, & R.C. Jones // *Vaccine.* – 1994. – Vol. 12. – P. 1225–1230.
6. Patnayak D.P. Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines / D.P. Patnayak, A. Tiwari, S.M. Goyal // *Avian Pathol.* – 2005. – Vol. 34. – P.123–126.
7. Picault J.P. Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome / J.P. Picault, Giraud P. Drouin [et al.] // *Vet. Rec.* – 1987 – Vol. 121. – P. 135.
8. Wilding G.P. Ciliostatic agent found in rhinotracheitis / G.P. Wilding, C. Baxter-Jones, M. Grant // *Vet. Rec.* – 1986. – Vol. 118. – P. 735.

References

1. Ben'esh-Mel'nik M.B., Dzh. Mel'nik. Markirujushhie priznaki virusa poliomielita i ih otnoshenie k virulentnosti shtamov virusa dlja obez'jan / V sb.: «Polioimielitnaja peroral'naja zhivajaja vakcina» M., 1961. pp. 210–223.
2. Borisova I.A. Razrabotka tehnologii izgotovlenija i kontrolja inaktivirovannoj vakciny protiv N'jukasl'skoj bolezni i metapnevmovirusnoj infekcii ptic: diss... kand. biol. nauk. Vladimir, 2008. 167 p.
3. Trocenko N.I., Belousova R.V., Preobrazhenskaja Je.A. Praktikum po veterinarnoj virusologii. M.: «Kolos», 2000. 272 p.
4. McDougall J.S. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations / J.S. McDougal, J.K.A. Cook // *Vet. Rec.* 1986. Vol. 118. pp. 206–207.
5. Naylor C. J. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. / C.J. Naylor, & R.C. Jones // *Vaccine.* 1994. Vol. 12. pp. 1225–1230.
6. Patnayak D.P. Growth of vaccine strains of avian pneumovirus in different cell lines / D.P. Patnayak, A. Tiwari S.M. Goyal // *Avian Pathol.* 2005. Vol. 34. pp. 123–126.
7. Picault J.P. Isolation of a TRT-like virus from chickens with swollen head syndrome / J.P. Picault, Giraud P. Drouin [et al.] // *Vet. Rec.* 1987. Vol. 121. p. 135.
8. Wilding G.P. Ciliostatic agent found in rhinotracheitis / G.P. Wilding, C. Baxter-Jones, M. Grant // *Vet. Rec.* 1986. Vol. 118. p. 735.