

УДК578.832.1:578.53.522

Э.Т. Тайлакова*, О.В. Червякова, К.Т. Султанкулова,
В.Л. Зайцев, А.Р. Сансызбай

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК,
пгт. Гвардейский, Кордайский район, Жамбылская область

*E-mail: tailakova_86@mail.ru

Изучение физико-химических свойств вируса гриппа лошадей

В данной статье приведены результаты изучения влияния физических и химических факторов на биологическую активность и структуру вирионов вируса гриппа лошадей А/лошадь/Отар/764/07(Н3N8), выделенного на территории Казахстана. Было изучено влияние следующих факторов: физических (Воздействие на вирус различных температур, рН-среды) и химических (Обработка протеазами, липидными растворителями и детергентами).

Ключевые слова: вирус, грипп лошадей, физико-химические свойства, нейраминидаза, гемагглютинин, антигенные свойства.

E.T. Tailakova, O.V. Chervyakova, K.T. Sultankulova,
V.L. Zaitsev, A.R. Sansyzbai

Study physical and chemical properties of equine influenza virus

The given paper presents the results of studying an influence of physical-chemical factors upon biological activity and structure of equine influenza virus virions A/equine/Otar/764/07 (H3N8) allocated on the territory of Kazakhstan. Thus, influence of physical (impact on a virus of various temperatures, pH – media) and chemical (protease, lipidic solvents and detergents) factors had been studied in the process.

Keywords: virus, equine influenza, physical-chemical factors, neuraminidase, hemagglutinin, antigenicity.

Э.Т. Тайлакова, О.В. Червякова, К.Т. Султанкулова,
В.Л. Зайцев, А.Р. Сансызбай

Жылқы тұмауы вирусының физика-химиялық қасиеттерін зерттеу

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде Қазақстан аумағында бөлініп алынған А/лошадь/Отар/764/07(Н3N8) жылқы тұмауы вирусы вириондарының құрылымына және биологиялық белсенділігіне физика-химиялық факторлардың әсері анықталды. Вирус құрылымына келесі факторлардың әсері анықталды: физикалық (әртүрлі температураның әсері, ортаның рН) және химиялық (протеазалар, липидті еріткіштер, детергенттер).

Түйін сөздер: вирус, жылқы тұмауы, физика-химиялық қасиеттер, нейраминидаза, гемагглютинин, антигенді қасиеттер.

Грипп лошадей – высококонтагиозное, респираторное заболевание, встречается во многих странах мира, в том числе и в Республике Казахстан. Грипп наносит коневодческим хозяйствам ощутимый ущерб, который складывается в основном из затрат на проведение профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Возбудитель инфекции – РНК-содержащий

вирус средних размеров (80-120нм), относящийся к семейству *Orthomixoviridae*. Вирион покрыт наружной и внутренней оболочками. Наружная содержит два гликопротеида – гемагглютинин и нейраминидазу, определяющих специфичность вирусов гриппа А. Гемагглютинин и нейраминидаза обуславливают важные свойства вирусов гриппа - токсигенность, иммуногенность, изменчивость. В настоящее время известно 16

подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы, которые образуют различные антигенные сочетания. Среди лошадей циркулируют два подтипа вируса гриппа: Influenza A equine 1(H7N7) – первый подтип Influenza A equine 2(H3N8) – второй подтип [1]. Вирус гриппа подвержен постоянным мутациям, в связи с этим происходит изменения не только антигенных свойств циркулирующих штаммов, но и их физико-химических свойств, таких как устойчивость в окружающей среде к воздействию факторов физической и химической природы.

Изучение физико-химических свойств вируса гриппа лошадей имеет существенное значение в решении фундаментальных проблем ветеринарной вирусологии и сельского хозяйства и обеспечит теоретическую базу для разработки средств специфической профилактики и диагностики, а также существенно скажется на улучшении противозооотических и профилактических мероприятий по предупреждению и ликвидации данной инфекции.

В настоящей работе приведены результаты изучения влияния физических и химических факторов на биологическую активность и структуру вирионов вируса гриппа лошадей А/лошадь/Отар/764/07(H3N8), выделенного на территории Казахстана.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали штамм вируса гриппа лошадей А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8). Вирус выращивали в аллантоисной полости куриных эмбрионов и очищали хроматографическим методом с использованием ДЕАЕ-целлюлозы [2].

Изучение структуры вирионов вируса гриппа проводили методом негативного контрастирования фосфорно-вольфрамовой кислотой. Препараты исследовали на электронном микроскопе JEM-100 CX JEOL (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 100000.

Воздействие на вирус различных температур. Очищенные суспензии вируса инкубировали в термоблоках с различной температурой.

Воздействие на вирус pH – среды. Осадки вируса после очистки ресуспендировали в буферных растворах с различными значениями pH.

Обработка протеазами. Очищенный вирус обрабатывали трипсином в концентрации 2,0 и 1,0 мг/мл и проназой в концентрации 0,1 и 0,05 мг/мл. Отношение субстрат – фермент составляло 1:3. Ферменты растворяли в растворе Хенкса, pH доводили до 7-8. Ферментативную реакцию проводили в ультратермостатах или термоблоках при 37°C в течение 1 часа. Действие фермента прекращали добавлением соевого ингибитора до конечной концентрации 1 мг/мл. Аналогично обрабатывали пробы контрольного материала, не содержащего фермент.

Обработка липидными растворителями. Липидные растворители (фреон 113, смесь хлороформ-метанол (2:1), эфир) добавляли к вирусной суспензии в соотношении 1:1, смеси встряхивали при 30°C 1 час. Фазы разделяли низкоскоростным центрифугированием и отбирали водные фазы для анализа.

Обработка вируса детергентами. Для обработки вируса использовали додецил сульфат натрия, дезоксихолат натрия, твин-20 и тритон X-100. К очищенному препарату вируса добавляли детергент в концентрации 0,1% (об/об). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C и постоянном встряхивании. От детергента освобождались центрифугированием смеси при 100000 g в роторе SW-50.1 в течение 45 мин. Осадок ресуспендировали в 0,05 М фосфатном буфере.

Гемагглютинирующую активность определяли по общепринятой методике [3].

Определение нейраминидазной активности. Активность нейраминидазы определяли по методике [4] используя фетуин в качестве субстрата.

Электрофоретический анализ белковых фракций проводили по методу [5].

Результаты и их обсуждение

В настоящее время имеется много работ о влиянии физических и химических факторов на свойства вируса гриппа [6-9]. Несмотря на интенсивность исследований иммунобиологических свойств вируса, проводимых во многих странах мира многие аспекты, касающиеся, физико-химических свойств вируса гриппа лошадей изучены недостаточно. Циркулируя в окружающей среде, вирус гриппа подвергается воздействию различных физических факторов, таких, как кислотность среды, высокая темпе-

ратура, воздействие УФ-лучей и др. Влияние некоторых из этих факторов стало предметом нашего изучения. Данные по устойчивости вируса гриппа к воздействию физических факторов может быть использовано при разработке средств и методов дезинфекции, а также инактивации вируса.

Результаты по изучению влияния рН среды на нейраминидазную и гемагглютинирующую активности вируса гриппа представ-

лены в таблице 1. Установлено, что нейраминидазная и гемагглютинирующая активности исследуемого вируса гриппа значительно выше при рН ~ 8.

Инкубация вируса при повышенных температурных режимах приводила к незначительному снижению нейраминидазной активности (таблица 2). Однако, даже прогревание при 56°C в течение 1 часа не приводило к полной инактивации нейраминидазы вируса.

Таблица 1 – Уровень нейраминидазной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа при различных значениях рН

рН	Нейраминидазная активность (n=3)	Активность гемагглютининов*
6,0-6,2	0,499±0,013	128
7,0-7,2	0,582±0,009	256
8,0-8,2	0,810±0,008	512

Примечание: «*» - обратное значение активности гемагглютининов

Таблица 2 – Значения гемагглютинирующей и нейраминидазной активности вируса гриппа штамма А/лошадь/Отар/764/2007 (H3N8) при воздействии высоких температур

Температура, °С	Активность гемагглютининов*			Нейраминидазная активность(n=3)		
	5 мин	30 мин	60 мин	5 мин	30 мин	60 мин
30	1024	512	512	0,696±0,098	0,485±0,012	0,529±0,010
37	1024	512	128	0,730±0,086	0,625±0,099	0,526±0,011
56	512	256	128	0,549±0,010	0,479±0,016	0,593±0,009
Контроль (4 °С)	256			0,735±0,008		

Примечание: «*» - обратное значение активности гемагглютининов

Далее представлены результаты изучения влияний химических факторов на нейраминидазную и гемагглютинирующую активности и структуру вируса гриппа лошадей.

Вирус гриппа содержит в своем составе липиды, белки, углеводы. Представляется важным выяснить роль этих компонентов в нейраминидазной, гемагглютинирующей активности и сохранении структуры вируса.

Как правило, для выяснения роли этих компонентов применяют обработку вируса веществами, вызывающими их растворение или гидролиз. Для удаления липидов используют

органические растворители и липолитические ферменты, для разрушения углеводов – воздействие глюкооксидазами, для разрушения белков – обработку протеазами. Однако такой прием не всегда позволяет сделать правильное заключение, так как обработка каким-то реагентом может не только удалить определенный компонент вируса, но и повлечь за собой конформационные изменения комплекса других структур вириона.

Результаты исследования влияния липидных растворителей на нейраминидазную и гемагглютинирующую активность и структуру вируса гриппа представлены в таблице 3.

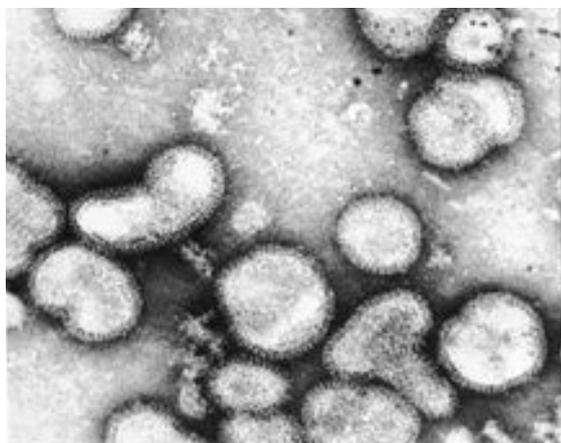
Таблица 3 – Значения нейраминидазной и гемагглютинирующей активности вируса гриппа лошадей под действием липидных растворителей

Реагент	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность (n=3)		% инактивации
	до обработки	после обработки		до обработки	после обработки	
Хлороформ-метанол (2:1)	256	0	100	0,702±0,091	0,004±0,018	99,44
Фреон 113	256	128	50	0,702±0,087	0,682±0,096	3,04
Эфир	256	128	50	0,702±0,094	0,038±0,008	94,57

Примечание: «*»-обратное значение активности гемагглютининов

Представленные в таблице 3 данные свидетельствуют о практически полной инактивации поверхностных белков вируса после экстракции липидов смесью хлороформ-метанол (2:1). В меньшей степени снижают активность гемагглютинина фреон-113 и эфир. Однако нейраминидазная активность сохраняется на прежнем уровне только при обработке фреоном-113.

Электронно микроскопический анализ препаратов вируса гриппа лошадей показал, что под действием липидных растворителей происходит удаление с наружной мембраны шипов гемагглютинина и нейраминидазы, разрыхление оболочки, вплоть до полного разрушения вириона (рисунок 1 Б).



А



Б

А – необработанный образец вируса гриппа, Б – вирус, обработанный фреоном -113

Рисунок 1 – Вирус гриппа лошадей, штамм А/лошадь/Отар/764/2007(Н3N8) после обработки липидными растворителями. Ув. 100000х

В результате исследований было установлено, что обработка вируса протеолитическими ферментами трипсином и проназой приводит к

существенной инактивации гемагглютинина, в то время как нейраминидазная активность остается практически на том же уровне (таблица 4).

Таблица 4 – Активность поверхностных белков вируса гриппа лошадей, штамм А/лошадь/Отар/764/2007(Н3N8) под действием протеолитических ферментов

Фермент	Концентрация фермента, мг/см ³	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность (n=3)		% инактивации
		до обработки	после обработки		до обработки	после обработки	
Трипсин	2	256	64	75	0,834±0,063	0,699±0,095	16
	1	256	32	87	0,834±0,075	0,809±0,081	3
Проназа	0,1	256	64	75	0,834±0,068	0,545±0,101	35
	0,05	256	64	75	0,834±0,071	0,746±0,087	11

Примечание: «*» - обратное значение активности гемагглютининов

Исследование образцов вируса, обработанных протеазами, методом электронной микроскопии, показало, что под действием ферментов основная часть популяции вирионов имела явные признаки разрушения оболочки с частичным удалением поверхностных шипов. Часть

вирионов находилась на стадии частичного или полного распада (рисунок 2).

При обработке вируса 80% раствором этанола отмечена полная инактивация как нейраминидазной, так и гемагглютинирующей активности вируса гриппа лошадей.

**Рисунок 2** – Электронная микроскопия вируса гриппа лошадей, штамм А/лошадь/Отар/764/2007 (Н3N8) после обработки трипсином. Ув.100000х

Результаты исследований показали, что после экстракции одного из компонентов вириона возбудителя гриппа – липидов – происходит разрушение вирусных частиц, сопровождаемое практически полной инактивацией вируса. Наименьший процент инактивации дает Фреон 113. 80% этанол по силе инактивирующего действия одинаков с фреоном 113. Смесь хлороформ-метанол (2:1) полностью инактивируют

гемагглютинирующую активность вируса. По данным Eckert E.A [10] гемагглютинин, выделенный, смесью хлороформ-метанол теряет гемагглютинирующую активность, но остается иммуногенным, т.е. при введении в организм животных вызывает выработку антигемагглютинирующих антител.

При воздействии на вирус протеолитических ферментов отмечено понижение нейрамини-

дазной и гемагглютинирующей активности при использовании низких концентраций, что связано с расщеплением молекулы гемагглютинина HA0 на HA1 и HA2.

Для выделения отдельных структурных компонентов вируса гриппа используют различные детергенты. Важно было выяснить степень воз-

действия некоторых из них на нейраминидазную и гемагглютинирующую активности и структуру вируса гриппа.

Результаты исследований по определению степени воздействия детергентов на активность вируса гриппа лошадей приведены в таблице 5 и на рисунках 3 и 4.

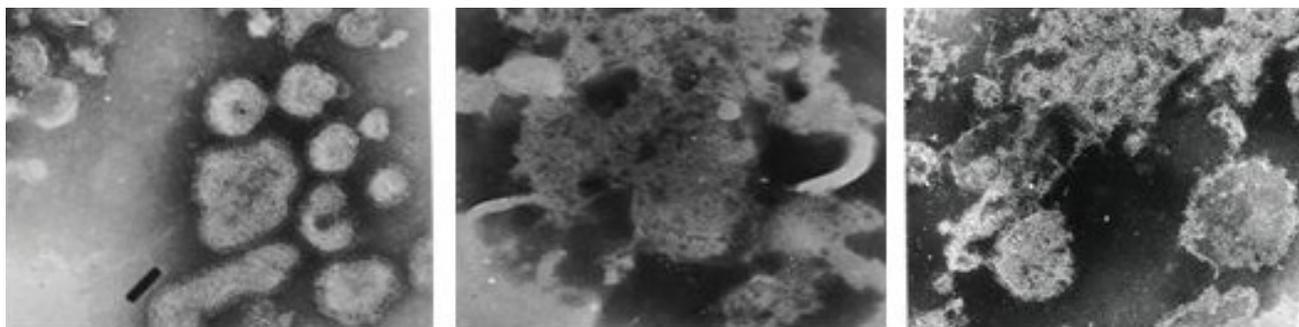
Таблица 5 – Нейраминидазная и гемагглютинирующая активности вируса гриппа лошадей, штамм А/лошадь/Отар/764/2007(H3N8) под действием детергентов

Детергент	Активность гемагглютининов*		% инактивации	Нейраминидазная активность (n=3)		% инактивации
	до обработки	после обработки		до обработки	после обработки	
ДСН	256	256	0	0,744±0,045	0,538±0,066	28
Тритон Х-100	256	256	0	0,744±0,033	0,617±0,053	17
Твин-20	256	128	50	0,744±0,041	0,570±0,075	23

Примечание: «*» - обратное значение активности гемагглютининов

Несмотря на то, что вирусные частицы под действием детергентов теряют целостность

(рисунок 3), поверхностные антигенные белки сохраняют свою активность (таблица 5).



А – контрольный образец вируса; Б – образец вируса, обработанный ДСН; В – образец вируса, обработанный твином-20

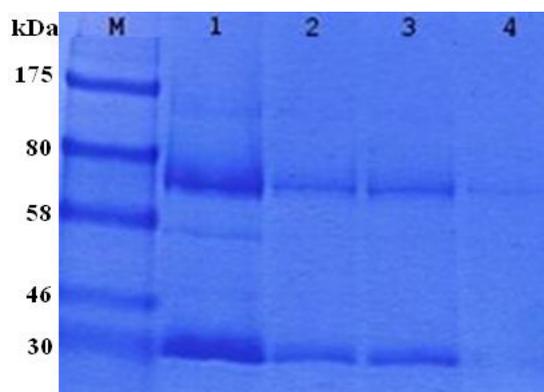
Рисунок 3 – Электронная микроскопия вируса гриппа лошадей штамма А/лошадь/Отар/764/2007 (H3N8) после обработки детергентами. Ув. 100000х

При обработке вируса гриппа лошадей детергентами степень дезинтеграции вирусных частиц зависит от активности самого реагента. При электронной микроскопии образцов, обработанных ионным детергентом додецилсуль-

фатом натрия (ДСН), выявлена глубокая дезинтеграция структуры вириона с выходом рибонуклеопротеида (РНП) (рисунок 3 Б). При обработке вируса твином 20 выявлено активное удаление шипов с поверхностной мембраны,

частичный или полный распад вирионов (рисунок 3 В). В отдельных не обработанных препаратах были обнаружены вирионы без признаков дезинтеграции (рисунок 3 А). Далее обработанные различными детергентами вирус

гриппа анализировали в ДСН-ПААГ. Как видно из рисунка 4, при воздействии на вирус гриппа лошадей различных детергентов существенных различий в электрофоретическом профиле не обнаружено.



М – маркер, BioLabs, 1 – вирус гриппа лошадей, штамма **А/лошадь/Отар/09 (H3N8)**, 2 – вирус после обработки ДСН, 3 – вирус после обработки твином-20, 4 – вирус после обработки тритоном X-100

Рисунок 4 – Полипептиды вируса гриппа после обработки детергентами

Заключение

Были изучены физико-химические свойства штамма вируса гриппа лошадей, выделенного на территории РК, результаты которых имеют как

фундаментальное, так и практическое значение и могут быть использованы при разработке профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Литература

- 1 Юров К.П. Профилактика гриппа лошадей//Ветеринария. – 1991. – №1. – С.34-36.
- 2 Тайлакова Э.Т., Червякова О.В., Садикалиева С.О. и др. Оптимизация условий очистки и концентрирования вируса гриппа лошадей// Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. – 2011. -№4(71). – С.14-23.
- 3 Siegert R., Braune P. The Pyrogens of Muxoviruses. II. Resistance of Influenza A Pyrogen to Heat, Ultraviolet and Chemical Treatment //Virology. – 1964. – V. 24. – P. 218-224.
- 4 Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Ветеринарная вирусология. – М.: Колос, 1984. – С.317-322.
- 5 Aymard-Henry M, Coleman MT, Dowdle WR, Laver WG, Schild GC, Webster RG. Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures // Bull World Health Organ. 1973;48(2):199-202.
- 6 Неклюдова Л.И., Орлова Н.Г., Макарова Г.И. Влияние физико-химических факторов на нейраминидазу вируса гриппа // Вопр. вирусол. – 1973. - №3. – С.338-341.
- 7 Мельникова С.К., Бусыгина О.Г., Шекутьева Н.А. и др. Характеристика гликопротеидов вакцинных штаммов вируса гриппа, солюбилизованных октил-β-d-глюкопиранозидом // Вопр. вирусол. – 1985. - №2. – С.153-158.
- 8 Webster R.G., Darlington R.W. Disruption of Muxoviruses with Tween-20 // J.Virology. – 1969. – V.4. – N. 2. – P. 182-187.
- 9 King J, Laemmli UK. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4 // J Mol Biol. 1971; Dec 28;62(3):465-477.
- 10 Eckert E.A. Properties of an Antigenic Glycoprotein isolated from influenza Virus Hemagglutinin // J. of Virology, 1973. – V. 11. – P. 183-192.