protein p54 / F. Rodriguez, C. Alcaraz, A. Eiras [et al.] // J. Virol. – 1994. - № 68 (11). – P. 7244-7252.

4. Казакова, А.С., Власова, Н.Н. Клонирование гена E183L (p54) вируса африканской чумы свиней/ А.С. Казакова, Н.Н. Власова/ Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Т.IV. Актуальные вопросы ветеринарной медицины, биологии и экологии: материалы II-ой Междунар. науч.-практ. конф./УГСХА. - Ульяновск, 2010. – С.81-85.

5. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Жуков А.Н., Цыбанов С.Ж., Калабеков И.М. Иммунобиологические и молекулярно-генетические свойства изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в Российской федерации (09-04-13759) Материалы Всероссийской научной конференции «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в агропромышленном комплексе России 14-15 апреля 2010 года». – РФФИ: Москва, 2010. – С.94-98.

УДК 619:578.832.1:616.98:636.5

ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА А ПТИЦ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОННОЙ И ИММУНОЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

А.С. Казарян, м.н.с., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области; тел.: 8 (49243) 6-2125; kazaryanas@mail.ru

В.Н. Пономарёв, д.в.н., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области 8 (49243) 6-2125.

М.Ю. Щелканов, д.б.н., доцент, ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России; тел.: 8 (499) 190-3052; adorob@mail.ru.

А.Т. Кушнир, д.в.н., профессор, ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области; тел.: 8 (49243) 6-2125.

Д.В. Куренков, к.б.н., ГНУ ВНИИВВМиВ Россельхозакадемии, г. Покров Владимирской области 8 (49243) 6-2125; dmit.kurenkov@gmail.com.

Е.А. Гущина, к.б.н., ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России; тел.: 8 (499) 190-3044; adorob@mail.ru.

Д.К. Львов, д.м.н., профессор, академик РАМН, ФГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздравсоцразвития России; тел.: 8 (499) 190-3074; dk_lvov@mail.ru.

Ключевые слова: вирус гриппа А, ортомиксовирусы, птицы, электронная микроскопия, иммуноэлектронная микроскопия.

В работе проведены результаты успешной верификации метода электронной и иммуноэлектронной микроскопии для индикации и идентификации вируса гриппа А птиц на модели высоковирулентного штамма A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1).

Введение.

Грипп (классическая чума) птиц – остро протекающая, высококонтагиозная болезнь домашних, синантропных и диких птиц. Заболевание протекает в виде эпизоотий с поражением желудочно-кишечного тракта, органов респираторного тракта, сосудистой и центральной нервной систем. Возбудителями болезни являются высоковирулентные штаммы вируса гриппа А – РНК-содержащего вируса из семейства *Orthomyxoviridae*, рода *Influenza A virus* [7, 14].

Дикие птицы водно-околоводного экологического комплекса (в первую очередь пластинчатоклювые *Anatidae* и чайковые *Laridae*) являются природным резервуаром вируса гриппа А [12, 13]. Благодаря высокой экологической пластичности, этот вирус способен проникать в популяции других хозяев

(в том числе – млекопитающих, включая человека), адаптироваться и длительно циркулировать в их популяциях [7, 13, 16, 17].

Вирион вируса гриппа А представляет собой сложную полиморфную структуру: встречаются как шарообразные (80–120 нм), так и нитчатые формы [8, 10]. Химический состав вириона: липиды (около 23.5–25.0 %), белки (63.2 %), углеводы (7.0 %), РНК (1.8 %) [1]. Белки оболочки: гемагглютинин (НА), нейраминидаза (NA) и М2. НА отвечает за связывание вириона с клеточными рецепторами (полисахаридами, терминированными остатком N-ацетилнейраминовой кислоты) и проникновение рибонуклеопротеида в клетку-мишень. Против НА направлены вирусонейтрализующие антитела. Вторым по значимости в возникновении иммунитета против гриппа является NA, которая осуществляет ферментативное отщепление терминального остатка N-ацетилнейраминовой кислоты. НА вируса гриппа А имеет 16, а NA – 9 различных подтипов, и все они были изолированы от различных видов птиц. М2 формирует ионный канал, закачивающий протоны внутрь вириона, что приводит к разрушению внешней липидной оболочки и высвобождению рибонуклеопротеида. Последний формирует ядро вириона и состоит из 8 генетических сегментов вирусного генома – PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS – в комплексе с белками NP, NS2 (NEP) и протеазами PB2, PB1 и PA [7, 8, 10]. Диаметр свёрнутого в кольцо нуклеопротеида составляет 8–10 нм [8].

В настоящее время, для индикации и идентификации вируса гриппа птиц наряду с известными серологическими реакциями (РГА, РТГА, ИФА, РДП) [5, 6, 14] широко используется ОТ-ПЦР в различных модификациях [3, 4] и метод биологических микрочипов [2], однако одним из наиболее надежных методов индикации и идентификации вируса гриппа А птиц по-прежнему является электронная и иммуноэлектронная микроскопия [8–11].

Целью нашей работы была верификация методики электронно-микроскопической индикации и идентификации высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1), получившего широкое распространение в экосистемах Северной Евразии, начиная с весны 2005 г., когда вирус был занесён мигрирующими дикими птицами по Джунгарскому пролётному пути из охваченной эпизоотией Юго-Восточной Азии [13, 15].

Материалы и методы.

Материалы: штамм высоковирулентного вируса гриппа A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1); забуференный физиологический раствор (ЗФР) с pH 7/2–7/4; 1 %-ая суспензия эритроцитов крови петуха; специфическая сыворотка крови козы против вируса гриппа А подтипа Н5 с титром 1 : 512 в РТГА.

Электронная микроскопия. Концентрированный и очищенный вирус получали на конечном этапе очистки центрифугированием в градиенте (20–60 %) плотности сахарозы. Приготовленный препарат наносили на медную сеточку с нитроцеллюлозной подложкой, напылённой углеродом, контрастировали 3–4 % фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК) при pH 7.0 и просматривали на просвечивающем электронном микроскопе Jeot Jem-100S при инструментальном увеличении в 15 000–40 000 раз.

Иммуноэлектронная микроскопия осуществлялась по методу, описанному М.Б. Королёвым (1980). На сеточку наносили по 5–10 мкл очищенного вируса, инкубировали 30–40 мин до почти полного испарения жидкости, затем наносили 10 мкл специфической сыворотки козы против вируса гриппа А подтипа Н5 (перед нанесением сыворотку с титром 1 : 512 дополнительно разбавляли ЗФР 1 : 100). Сеточку помещали во влажную камеру и инкубировали 30 мин при 37° С (избыток влаги удаляли фильтровальной бумагой) и наносили 5 мкл белка А, меченного коллоидным золотом, в разведении от 1 : 5 до 1 : 10 на ЗФР. Через 15–30 мин препарат промывали дистиллированной водой, подсушивали и контрастировали 3–4 % ФВК. Приготовленный препарат просматривали под электронном микроскопом (´ 15 000–40 000).

Результаты и обсуждение полученных результатов.

Электронная микроскопия показала, что вирионы использованного штамма высоковирулент-

ного вируса гриппа A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1) представляют собой полиморфные частицы размером 80–120 нм (рис. 1). По размеру и форме вирионы соответствуют таковым вируса гриппа А.

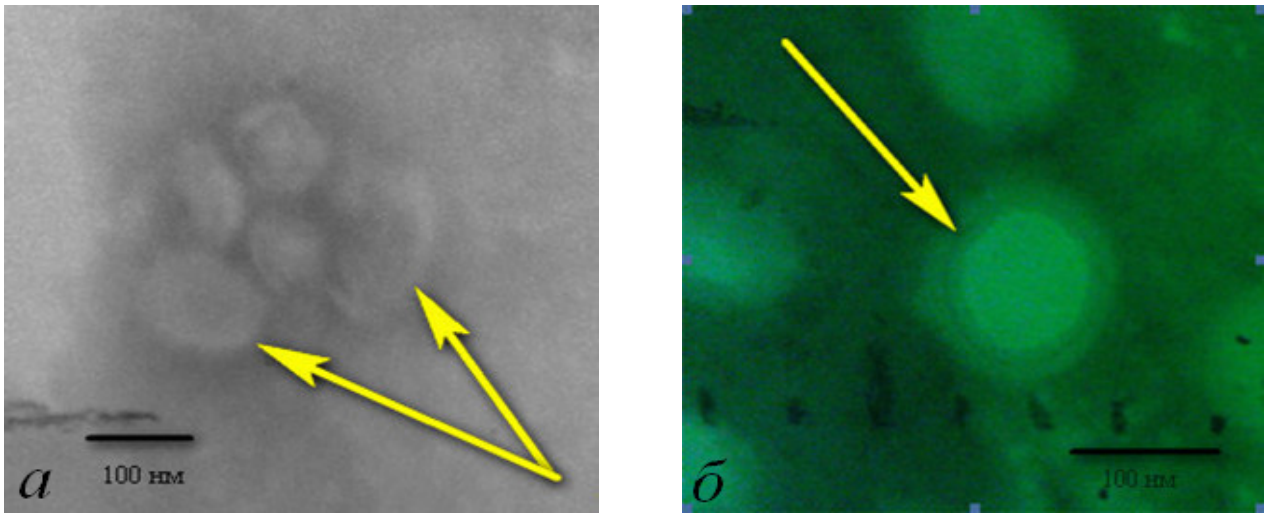

Рисунок 1. Вирионы штамма A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1) в электронном микроскопе при: а - негативном контрастировании; б - инструментальном увеличении (150 000).

Иммуноэлектронная микроскопия выявила на поверхности вирусных частиц или вблизи их иммунные комплексы в виде чёрных точек. Иммунный комплекс включал в себя значительное количество антител, выявляемых белком А, связанных с коллоидным золотом, что значительно облегчало их визуализацию (рис. 2).

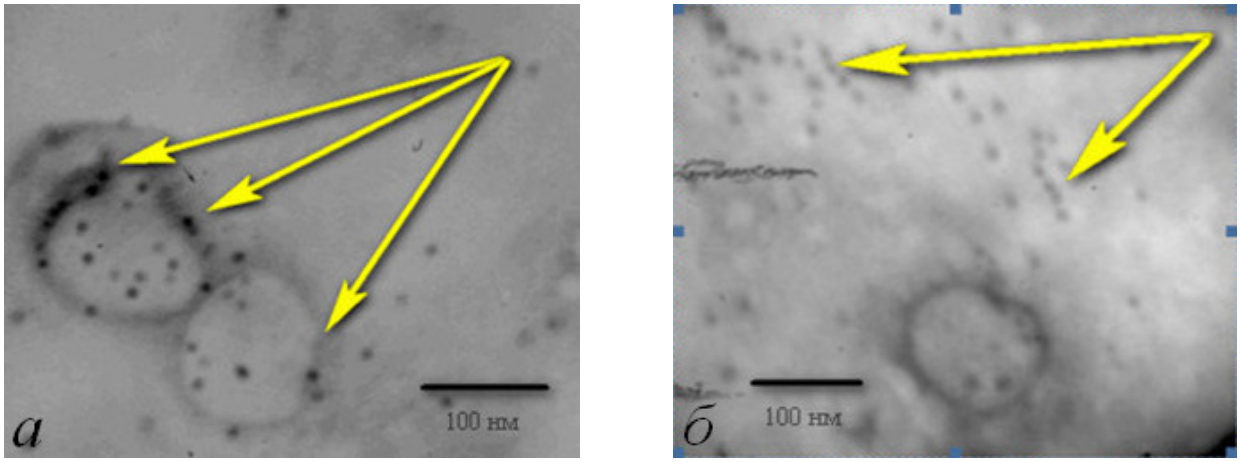

Рисунок 2. Результат взаимодействия специфической антисыворотки против HA/H5: а - со штаммом A/grebe/Tyva/Tyv06-1/2006 (H5N1);
б - с гетерологичным вирусом гриппа А подтипа Н1.

В качестве контроля использовался вирус гриппа А птиц подтипа Н1. На рис. 1, б видно, что иммунные комплексы с вирусом гриппа подтипа Н1 не образовывались.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать использование метода электронной и иммуноэлектронной микроскопии для индикации и идентификации вируса гриппа А птиц в научно-исследовательской работе.

Литература

1. Гараев М.М. Структурные компоненты и химический состав вирионов // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 47–52.

2. Гребенникова Т.В. Биочипы // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. –С. 339–343.

3. Гребенникова Т.В., Бобкова М.Р., Альховский С.В. Полимеразная цепная реакция // В кн.:

Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. –С. 330–335.

4. Гребенникова Т.В., Бобкова М.Р., Альховский С.В. Полимеразная цепная реакция в реальном времени // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. –С. 335–339.

5. Дерябин П.Г., Бутенко А.М. Реакция биологической нейтрализации (РН) // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 301–310.

6. Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Бурцева Е.И. Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА) // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 312–317.

7. Каверин Н.В., Львов Д.К. Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae) // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 176–183.

8. Клименко С.М. Структура вириона // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 52–61.

9. Клименко С.М., Григорьев В.Б., Маныкин А.А. Электронная микроскопия (ЭМ) // В кн.: Медицинская вирусология. Руководство / Ред.: академик РАМН Д.К. Львов. – М.: МИА, 2008. – С. 303–307.

10. Клименко С.М., Селиванов Я.М., Меньших Л.К., Меньших Л.К., Глаголев А.А. Структура вириона вируса гриппа // Вопросы вирусологии. – 1965. – № 3. –С. 315–319.

11. Королёв М.Б. Электронно-микроскопические методы выявления вирусов // В кн.: Электронная микроскопия вирусов и вирусных инфекций. Итоги науки и техники. – Сер. «Вирусология». – М.: ВИНИТИ, 1980. – 114–157.

12. Львов Д.К. Возможное значение природных биоценозов в изменчивости вируса гриппа А // Вопросы вирусологии. – 1974. – № 6. – С. 740–744.

13. Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А – дикие и домашние животные – человек; причины и последствия проникновения на территорию России высокопатогенного вируса гриппа A/H5N1 // ЖМЭИ. – 2006. – № 3. – С. 96–100.

14. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИИТИБП, 1998. – 928 с.

15. Щелканов М.Ю. Эволюция высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в экосистемах Северной Евразии // Автореф. дис. … д.б.н. – М.: НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, 2010. – 53 с.

16. Webster R.G. Strain surveillance in animals and birds // Influenza: virus, vaccines and strategy. – Rongemont, 1976. – P. 33–37.

17. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution of influenza A virus // Microbiol. Rev. – 1992. – V. 56. – N 1. – P. 152–179.