

Свойства вирусов крупного рогатого скота, консервированных при умеренно-низких температурах

М.Ю. СТЕГНИЙ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Properties of Cattle Viruses, Preserved at Moderately Low Temperatures

STEGNIY M.YU.

National University of Pharmacy, Kharkov

Представлены результаты исследований по изучению инфекционных, антигенных, иммуногенных свойств вирусов, хранившихся в условиях умеренно низких температур. Установлено снижение инфекционной активности и иммуногенных свойств вирусов в процессе долгосрочного хранения. Некоторые штаммы полностью инактивировались в данных условиях.

Ключевые слова: умеренно низкие температуры, антигенная специфичность, иммуногенные свойства, инфекционная активность.

Представлено результати досліджень по вивченню інфекційних, антигенних, імуногенних властивостей вірусів, що зберігалися в умовах помірно низьких температур. Установлено зниження інфекційної активності й імуногенних властивостей вірусів у процесі довгострокового збереження. Деякі штами цілком інактивувалися у даних умовах.

Ключові слова: помірно низькі температури, антигенна специфічність, імуногенні властивості, інфекційна активність.

The results of investigations on the study of infectious, antigenic and immunogenic properties of viruses stored under moderately low temperatures are presented. The decrease of infectious activity and immunogenic properties of viruses is found during a long-term storage. Some strains are completely inactivated under these conditions.

Key words: moderately low temperatures, antigenic specificity, immunogenic peculiarities, infectious activity.

Согласно требованиям Good Manufacturing Practice (GMP) обеспечение качества вирусных биологических препаратов невозможно без разработки надежных методов хранения исходного вирусного сырья, эталонных и производственных штаммов вирусов. До настоящего времени многочисленные штаммы вирусов, которые используют для изготовления биологических препаратов, хранят в условиях умеренно низких температур.

Цель наших исследований – изучение свойств вирусов, замороженных и заложенных на долгосрочное хранение при -18°C (сохранность инфекционной активности, антигенной специфичности и иммуногенных свойств вирусных суспензий).

Материалы и методы

Исследования были проведены на 11 образцах 4 штаммов вируса инфекционного ринотрахеита -пустуллезного вальвовагинита крупного рогатого скота (ИРТ-ИПВ): “Молдавский”, “ТК ВИЭВ”, “Монорин”, “Оренбург”; пяти образцах неочищенного вируса парагриппа-3 (ПГ-3) штаммов “М-87”, “ЗКСМ”; двух образцах вируса диареи крупного рогатого скота штаммов “Oregon C-24V”, “УНДІЄВ-25”. Вирусы были предоставлены Институтом экспериментальной и клинической ветеринарной медицины УААН. Хранились в холодильнике при -18°C . Биологическую активность виру-

According to the Good Manufacturing Practice (GMP) requirements it is impossible to provide the quality of viruses of biological preparations without the invention of the methods of preserving the initial viral sources, standard and industrial strains of viruses. Till nowadays numerous strains of viruses, used to produce biological preparations, are stored under moderately low temperatures.

The aim of our research was the study of the viruses' peculiarities of frozen and subjected for a long-term storage and the effect at -18°C on keeping an infectious activity, antigenic peculiarity and immunogenic peculiarities of viral suspensions.

Materials and methods

There were investigated 11 samples of 4 virus strains of infectious rhinotracheitis, pustular cattle vulvovaginitis (IRT-IPV): “Moldavskiy”, “TK VIEV”, “Monorin”, “Orenburg”; five samples of paragrippe-3 virus (PG-3) of “M-87”, “ZKSM” strains; two samples of diarrhea cattle virus of “Oregon C-24V”, “UNDIEV-25” strains. The viruses were provided by the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of UAAS. They were kept in the refrigerator at -18°C . The biological activity of viruses was recovered by their cultivation during one passage in sensitive recultured cell cultures on sheep's kidney (SK), calf's trachea (CT), calf's coronary vessel

Адрес для корреспонденции: Стегний М.Ю., Национальный фармацевтический университет, ул. Пушкинская, 53, г. Харьков, Украина 61002; тел.: +38 (0572) 471682, факс: +38 (0572) 470164

Address for correspondence: Stegny M.P., National University of Pharmacy, 53, Pushkinskaya str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +38 (0572) 471682, fax: +38 (0572) 470164

сов восстанавливали культивированием их в течение одного пассажа на чувствительных перевиваемых клеточных культурах почки овцы (ПО), трахеи телят (ТТр), коронарных сосудах телят (КСТ). Титр инфекционной активности определяли по цитопатическому действию (ЦПД) вирусов на перевиваемые культуры клеток [2]. Антигенную специфичность вирусов ИРТ-ИПВ исследовали в качественной реакции нейтрализации [4], вирусов ПГ-3 – в реакции торможения гемагглютинации [2], диареи – методом иммунной электронной микроскопии [3]. Иммуногенные свойства вирусов, не инактивировавшихся в процессе хранения, изучали путем определения титра специфических противовирусных антител в сыворотках крови иммунизированных вирусом ИРТ-ИПВ штаммом “Молдавский” морских свинок; штаммом “Монорин” – кроликов. Вирусы вводили по 2 мл внутримышечно в заднюю конечность с интервалом между введениями 14 дней, а через 14 дней после второго введения животное обескровливали [1]. Титр специфических противовирусных антител определяли в реакции нейтрализации [4].

Результаты и обсуждение

Результаты выявления инфекционной активности вирусов, хранившихся различное время в условиях умеренно низких температур, представлены в таблице. Из таблицы видно, что инфекционная активность вакцинного штамма “ТК ВИЭВ”, хранившегося от 10 до 17 лет при -18°C, была полностью утрачена. Также инактивировались инфекционные свойства вируса ИРТ-ИПВ эпизоотического штамма “Оренбург”, хранившегося в данных условиях в течение 17 лет. Снижение инфекционной активности штамма “Молдавский” от 12.03.93 и 20.04.00 наблюдалось на 2 порядка по сравнению с исходной. Титр инфекционной активности вакцинного штамма “Монорин” после размораживания снизился на 3 порядка по сравнению с исходным. Характер цитопатического действия вирусов на клеточные культуры ПО и КСТ не изменился (рис. 1-4).

Восстановление гемагглютинирующих свойств вирусов парагриппа штамма “ЗКСМ” стало возможным лишь после проведения 15 пассажей на перевиваемой культуре ПО. При этом титр гемагглютинации составил 3,5 гемагглютинирующих единиц при нулевом значении титра инфекционной активности при 10-кратном разведении вируса.

Определение титра инфекционной активности вируса парагриппа штамма “М-87” от 05.02.01 и от 02.04.01 при 10-кратном разведении также показало нулевые значения.

(CCV). The titer of infectious activity was indicated by cytopathic influence of viruses on recultured cell cultures [2]. The antigenic peculiarity of viruses IPT-IPV was analyzed in qualitative reaction of neutralization [4], the one for PG-3 viruses was done in the reaction of gemagglutination inhibition [2], for diarrhea by the method of immune electron microscopy [3]. Immunogenic peculiarities of viruses which were not inactivated in the process of storage were observed by determining the titer of specific antiviral antibodies in blood serum of guinea pigs immunized with IPT-IPV “Moldavskiy” strain, and for rabbits by “Monorin” strain. Viruses were injected by 2 ml intramuscularly into posterior extremity with the intervals of 14 days, and in 14 days after the second injection the animal was dehematized [1]. The titer of specific antiviral antibodies was examined in the neutralization reaction [4].

Results and discussion

The results of the exposure of infectious activity of viruses, which were stored within various time periods under moderately low temperatures are shown in the Table. The table demonstrates that the infectious

Результаты выявления инфекционной активности вирусов крупного рогатого скота, хранившихся при -18°C
The results of revealing of infectious activity of cattle viruses, which were kept at -18°C

Название вируса Virus	Название штамма Strain	Дата замора – живания Date of freezing	Время хранения (годы) Storage term (years)	Выявление инфекционной активности Revealing of infectious activity
ИРТ – ИПВ IRT – IPV	ТКВИЭВ TKVIEV	11.04.85	17	–
		20.04.87	15	–
		19.07.88	14	–
		07.07.89	13	–
		08.06.89	13	–
		25.01.92	10	–
	"Оренбург" "Orenburg"	24.10.85	17	–
	"Молдавский" "Moldavskiy"	23.10.84 12.03.93 20.04.00	18 9 2	– + +
	"Монорин" "Monorin"	29.06.94	8	+
	ПГ – 3 PG – 3	"М – 87"	10.03.87 04.09.87 05.02.01 02.04.01	15 14 1 1
"ЗКСМ" "ZKSM"			08.06.89	11
Вирус диареи Diarrhea virus	"Oregon C – 24V"	08.02.92	10	+
	"УНДІЄВ – 25" "UNDIEV – 25"	06.02.92	10	+

Примечания: + - инфекционная активность вирусов выявлена; – - инфекционная активность не выявлена.

Notes: “+” : infectious activity of viruses is found ; “-” : infectious activity is not found .

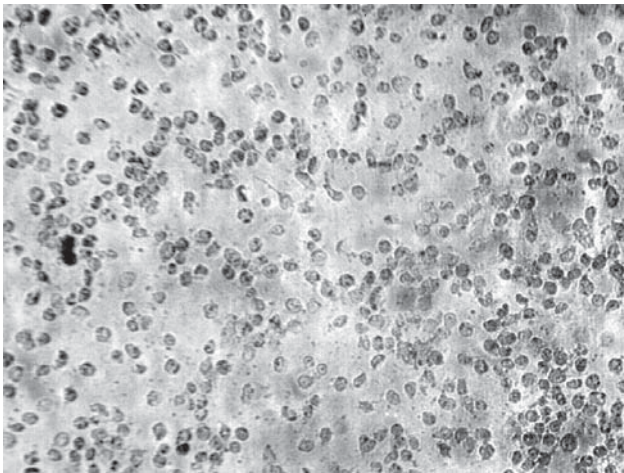


Рис. 1. Цитопатическое действие вируса ИРТ-ИПВ штамм "Молдавский" от 20.04.00 на культуру перевиваемых клеток ПО. 48 ч после заражения. $\times 200$.

Fig. 1. Cytopathic influence of virus of IRT-IPV "Moldovian" strain of 20.04.00 on the culture of recultured cell of SK, 48 hrs after infection. $\times 200$.

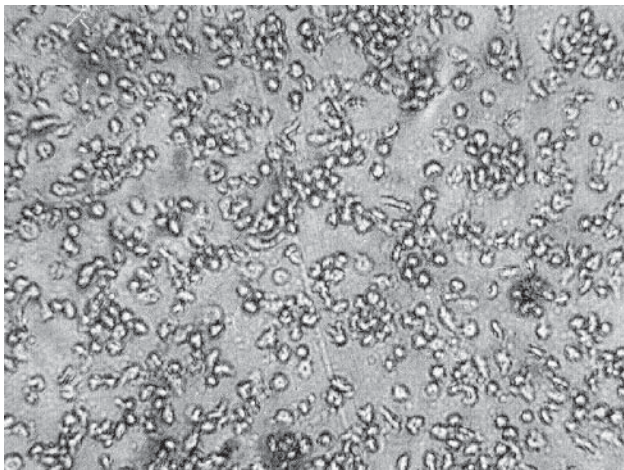


Рис.2. Цитопатическое действие вируса ИРТ-ИПВ штамм "Молдавский" от 12.03.93 на культуру перевиваемых клеток ПО. 72 ч после заражения. $\times 200$.

Fig.2. Cytopathic influence of virus of IRT-IPV "Moldovian" strain of 12.03.93 on the culture of recultured cell of SK, 72 hrs after infection. $\times 200$.

Инфекционная активность вируса диареи эталонного штамма "Oregon C-24V" снизилась на 3 lg. Несколько меньшее снижение инфекционной активности (1,5 – 2,0 lg) наблюдалось у эпизоотического штамма "УНДІЄВ-25". Таким образом, все исследованные штаммы вирусов, которые не потеряли инфекционную активность в процессе хранения, снизили ее показатели по сравнению с исходными значениями. Антигенная специфичность вирусов с выявленными инфекционными свойствами сохранилась полностью.

При изучении иммуногенных свойств вирусов, консервированных в данных условиях, было

activity of "TK VIEV" strain, which was under storage from 10 to 17 years at -18°C , was completely lost.

The infectious properties of IRT-IPV viruses of "Orenburg" epizootic strain, which was kept under these conditions for 17 years were inactivated as well. The reduction of infectious activity of "Moldovskiy" strain of 12.03.93 and of 20.04.00 was observed by 2 orders in comparison with the initial one. The titer of infectious activity of "Monorin" vaccine strain after freeze-thawing was reduced by 3 orders in comparison with the initial one. The character of the cytopathic influence of viruses on cell cultures of SK and CCV has not changed (Fig.1-4).

The reduction of infectious properties of paragripe viruses of "ZKSM" strain became possible only after 15 passages in recultured SK culture. In this case the titer of haemagglutination made 3.5 haemagglutinating units at zero value of the titer of infectious activity at 10-fold virus dilution.

The determination of the titer of haemagglutinating activity of paragripe viruses of "M-87" strain of 05.02.01 and of 02.04.01 at 10-fold virus dilution has also shown the zero value.

The infectious activity of diarrhea virus of "Oregon C-24V" standard strain was reduced down to 3 lg. A little bit lower reduction of infectious activity (1,5-2,0 lg) was observed for "UNDIEV-25" epizootic strain. Thus, all the investigated virus strains, which have not lost the infectious activity in the storage process, reduce the indices in comparison with the initial value. The antigenic peculiarity of viruses with the exposed infectious peculiarities has remained as a complete.

During the studying of immunogenic properties of viruses which were preserved under these conditions we have noticed the diminution of the titer of special

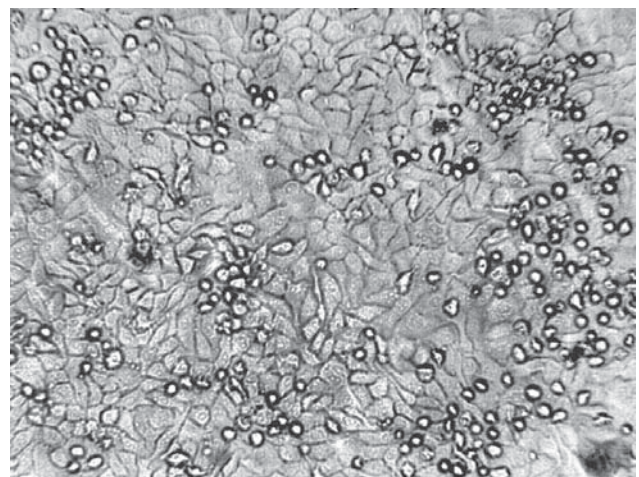


Рис.3. Цитопатическое действие вируса ИРТ-ИПВ штамм "Монорин" от 29.06.94 на культуру перевиваемых клеток ПО. 48 ч после заражения. $\times 200$.

Fig.3. Cytopathic influence of virus of IRT-IPV "Monorin" strain of 29.06.94 on the culture of recultured cell of SK, 48 hrs after infection $\times 200$.

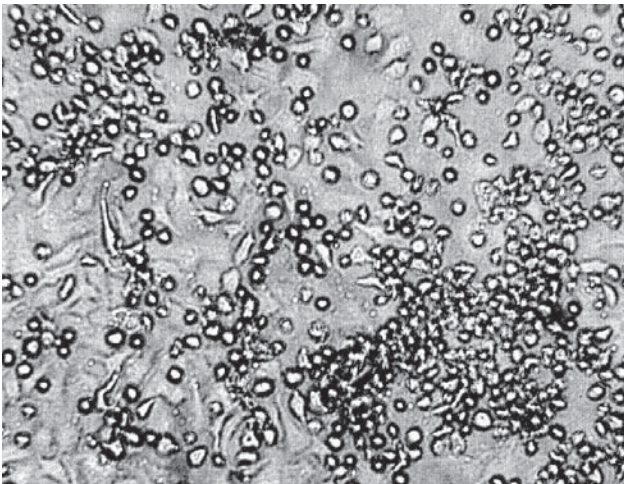


Рис.4. Цитопатическое действие вируса ИРТ-ИПВ штамм “Монорин” от 29.06.94 на культуру перевиваемых клеток ПО. 72 ч после заражения. $\times 200$.

Fig.4. Cytopathic influence of virus of IRT-IPV “Monorin” strain of 29.06.94 on the culture of recultured cell of SK, 72 hrs after infection. $\times 200$.

отмечено снижение титра специфических противовирусных антител в сыворотках иммунизированных животных. Титр специфических противовирусных антител у животных, иммунизированных вирусом, консервированным в условиях умеренно низких температур, составил 1:32, а иммунизированных нативным вирусом – 1:128.

Выводы

Таким образом, замораживание и хранение исследованных штаммов вирусов в условиях умеренно низких температур ведут или к полной потере их инфекционной и иммуногенной активности или к снижению значений этих показателей. Поэтому необходима разработка оптимальных режимов консервирования при более низких температурах, чем -18°C , позволяющих сохранить исходные биологические свойства вирусных суспензий, используемых в биотехнологии производства биологических препаратов,

Литература

1. *Иммунологические методы* / Под ред. Г. Фримеля. Пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
2. Лярски З. Диагностика вирусных болезней животных / Пер. с пол. Т.Г. Орловой и Я.С. Ляндсберга. Под ред. В.Н. Сюрица. – М.: Колос, 1980. – 399 с.
3. *Ускоренные методы лабораторной диагностики вирусных инфекций* / Доклад научной группы ВОЗ // Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1983. – 59 с.
4. Habel K., Salzman N.P. *Fundamental Techniques In Virology* / Пер. с англ. Л.Б.Меклера. – М.: Мир, 1972. – 444 с.

Поступила 02.07.2003

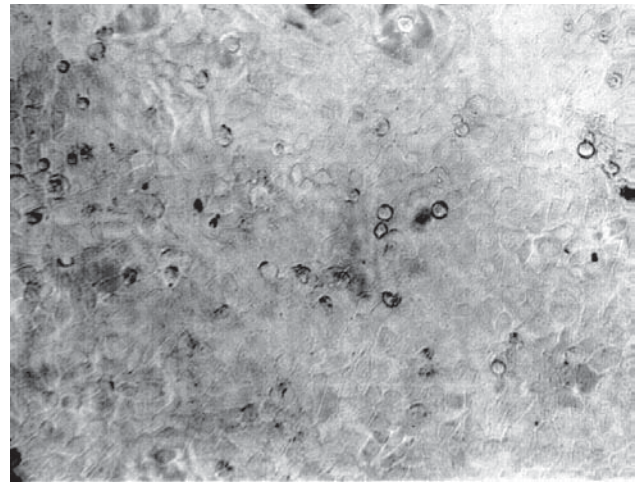


Рис. 5. Незараженная перевиваемая клеточная культура ПО. $\times 200$.

Fig. 5. Non-infected recultured SK cell culture. $\times 200$.

antivirus antibodies in the serum of immunized animals. The titer of the special animal antivirus antibodies which were immunized by virus preserved under conditions of moderately low temperatures made 1:32, and those immunized by native virus made 1:128.

Conclusions

Thus, freezing and storage of the studied strains of viruses under moderately low temperatures leads to a complete loss of their infectious and immunogenic activity or to the reduction of the values of these indices. Therefore the working-out of optimum preservation regimens at the temperatures under -18°C is needed. This will help to keep the biological properties of virus suspensions, used in biotechnology of biological preparations' production.

References

1. *Immunology methods* / Ed. by G. Frimel. Translated from German by Tarasova. – Moscow: Meditsina, 1987. – 472 p.
2. *The diagnostics of viral diseases of animals* / Lyarski Z. Translated from Polish by Orlova and Lyandsberg Ya.S. Ed. by Surin V.N. – Moscow: Kolos, 1980. – 399 p.
3. *Advanced methods of laboratory diagnoses of viral infections*. Report of the WHO scientific group // World Health Organization. – Geneva, 1983. – 59p.
4. Habel K., Salzman N. P. *Fundamental Techniques In Virology* / Translated from English by Mekler L.B. – Moscow: Mir, 1972. – 444p.

Accepted in 02.07.2003