

УДК: 619: 59.083: 615.371: 616.34-002: 636.598

*П.С. ЮРКО, младший научный сотрудник лаборатории профилактики заболеваний птиц и молекулярной диагностики
Институт животноводства НААН Украины*

Полимеразная цепная реакция как эффективный метод контроля инактивации парвовируса при изготовлении вакцины против вирусного энтерита гусей

У статті показана ефективність використання полімеразної ланцюгової реакції як методу контролю інактивації парвовіруса етиленіміном при виготовленні вакцини проти вірусного ентериту гусей. Результати, що отримані з використанням полімеразної ланцюгової реакції, були підтверджені шляхом проведення послідовних пасажів у культурі клітин ембріонів гусей. Застосування молекулярно-генетичних методів дозволяє скоротити час на проведення контролю інактивації у 72 рази порівняно зі стандартним методом у культурі клітин.

Вірусний ентерит гусей, парвовірус, полімеразна ланцюгова реакція, інактивація, етиленімін

Применение безопасных и эффективных биопрепаратов является одним из необходимых условий успешной профилактики инфекционных заболеваний в животноводстве. Живые и инактивированные вакцины обладают своими недостатками и преимуществами. Наиболее значимые преимущества инактивированных вакцин – стабильность, способность вызывать более длительный иммунитет у привитой птицы, невозможность реверсии вируса и загрязнения окружающей среды патогенами, возможность использования нескольких инактивированных вирусов при однократной вакцинации, что делает такие биопрепараты более перспективными для изготовления и применения в практике ветеринарной медицины [1].

Инактивация вирусов – один из важных этапов при производстве вакцин против бактериальных и вирусных инфекций. Инактивация должна быть не только эффективной, но и максимально селективной, то есть при минимальном изменении структуры капсида не должны восстанавливаться инфекционные и снижаться иммуногенные свойства вируса [5]. Для инактивации вирусов применяются физические (различные излучения, воздействие высокими температурами и т.д.) и химические методы (формальдегид, β -пропиолактон, гидроксилламин, этиленимин и т.д.). Выбор способа инактивации основывается на механизме действия инактиванта и свойствах инактивируемого вируса [4, 7].

Инактиванты оказывают различное действие на вирусы: одни действуют на нуклеиновую кислоту вирусов, другие – на вирусные белки, третьи – обладают комбинированным действием. Наиболее часто при изготовлении биопрепаратов в качестве инакти-

вантов используют формальдегид, β -пропиолактон (БПЛ) и этиленимин (ЭИ).

Так, действие формальдегида основывается на избирательном разрушении антигенных детерминант поверхностных гликопротеинов вирусов, а также образовании комплексов нуклеиновой кислоты с белками капсида. Недостатком его применения является обратимость реакций с аминогруппами и возможность восстановления активности нуклеиновой кислоты, следствием чего может стать реверсия вируса [2, 5, 13].

БПЛ производит структурную модификацию нуклеиновых кислот путем алкилирования и депуринизации, а также замещения пар оснований и образования поперечных сшивок. Высокая степень мутагенности и реакционной способности БПЛ способствует быстрому разрушению ДНК, а также инактиванта до неканцерогенных побочных продуктов [2, 11].

Инактивирующее действие этиленимина (ЭИ) и его производных сходно с БПЛ и объясняется алкилированием, депуринизацией и последующей деполимеризацией нуклеиновых кислот [6]. Модификация нуклеиновой кислоты вируса происходит преимущественно на N-7, N-3 и N-1 пуринов и в меньшей степени, N-3 пиримидинов [13]. Преимущество этиленимина в сравнении с β -пропиолактоном/формалином заключается в избирательном действии только на нуклеиновые кислоты вирусов, при этом изменения структуры эпитопов не происходит [12].

Общепринято проводить контроль инактивации в чувствительных тест-системах (эмбрионы, клеточные культуры, чувствительные животные и т.д.)

путем проведения последовательных пассажей. Однако данные методы дорогостоящие, трудо- и времязатратные [7, 10, 14].

Согласно литературным данным, применение молекулярно-генетических методов (таких как полимеразная цепная реакция является перспективным для контроля инактивации вакцин при условии применения инактиванта, действие которого направлено на нуклеиновую кислоту [2, 7]. Так, например, показана высокая эффективность применения полимеразной цепной реакции как метода контроля инактивации при производстве вакцины против гепатита А [9].

В Институте животноводства (отделение птицеводства) НААН разработаны и производятся биопрепараты для профилактики одной из наиболее опасных болезней гусей – вирусного энтерита (болезни Держи), возбудителем которого является парвовирус (Goose Parvovirus, GPV). Инактивированная вакцина против вирусного энтерита гусей (регистрационное удостоверение №ВВ-00337-02-11 от 01.07.2011 года) создана на основе патогенного штамма ХМ-99 парвовируса, инактивированного этиленимином и объединенного с адьювантом. Контроль инактивации вируса осуществляется путем проведения последовательных пассажей в культуре фибробластов эмбрионов гусей. Как уже было сказано, этот метод достаточно трудоемкий и ресурсозатратный. В связи с этим **цель данной работы** – изучение возможности использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) в качестве

Результаты контроля эффективности инактивации парвовируса в культуре фибробластов эмбрионов гусей

Конечная концентрация этиленимина, %	Время инактивации, часы		
	24	36	48
	титр вируса после инактивации, Ig ТЦД50		
0,15	1,88±0,1	1,5±0,3	–
0,2	–	–	–
Контроль вируса	7,2±0,3	7,3±0,4	7,2±0,2

метода контроля эффективности инактивации парвовируса этиленимином при производстве вакцины против вирусного энтерита гусей (болезни Держи).

Материал и методы исследований.

Исследования проводились в лаборатории профилактики заболеваний птицы и молекулярной диагностики Института животноводства НААН Украины.

Для проведения исследований использовали культуральную вирусосодержащую жидкость до и после инактивации.

ДНК выделяли с помощью набора реагентов “ДНК Сорб-В” (Амплисенс, Россия) согласно прилагаемой инструкции. ПЦР проводили с помощью реагентов Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) с использованием программируемого термоциклера “Терцик» (“ДНК-технология», Россия). Объем конечной смеси составил 20 μL, концентра-

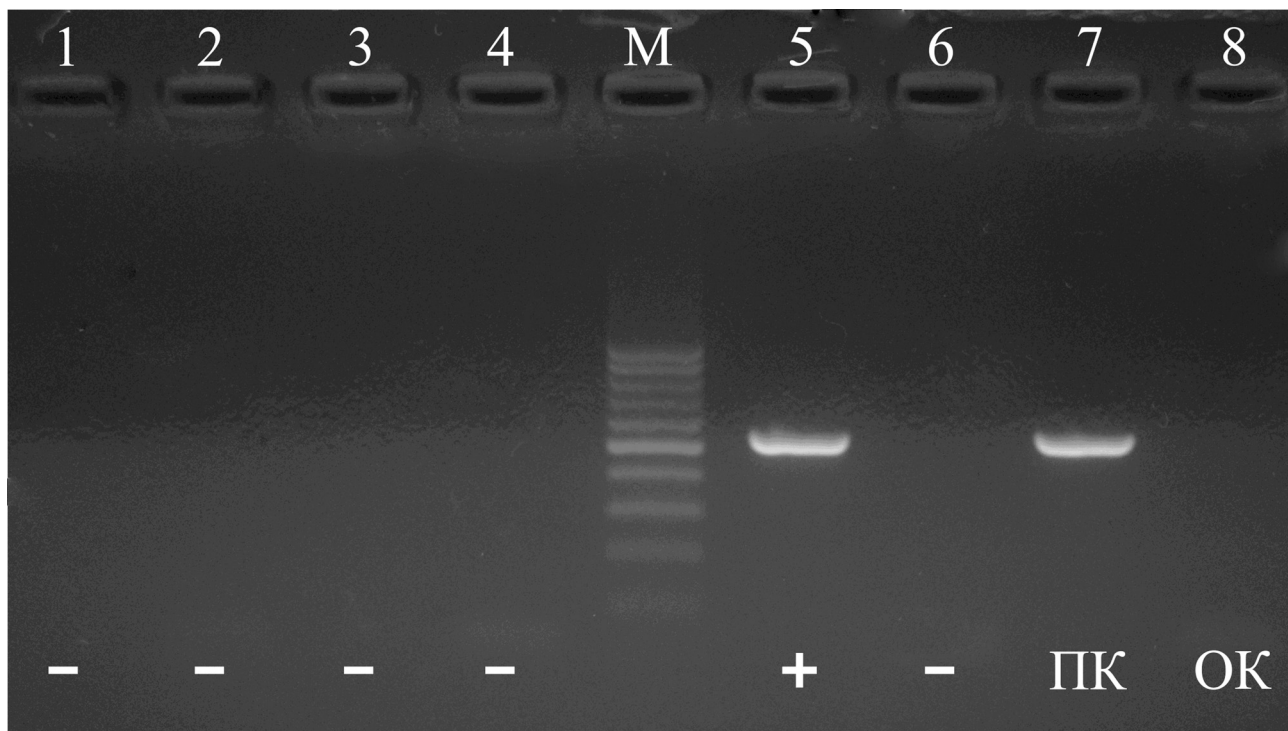


Рис. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов ДНК парвовируса из образцов культуральной вирусосодержащей жидкости. 1 – 8 – номера проб; М – маркер молекулярных масс М-100; + – наличие GPV; – – отсутствие GPV; ПК – положительный контроль; ОК – отрицательный контроль.

ция праймеров – 0,4 μ M. Для детекции генома парвовируса использовали праймеры, фланкирующие консервативный участок гена VP3. Амплификацию проводили соответственно следующей схемы: один цикл – 94 °C (1 мин); 35 циклов – 94 °C (15 с), 50 °C (30 с), 72 °C (30 с); один финальный цикл – 72 °C (5 мин).

Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в течение 45 мин при 120 V. Пробы визуализировали с помощью этидиума бромид в ультрафиолетовом спектре с использованием трансиллюминатора. Размер амплифицированных фрагментов определяли с помощью маркера молекулярных масс M-100.

Культуру фибробластов эмбрионов гусей получали из кожно-мышечной ткани 14-16-суточных гусиных эмбрионов по общепринятой методике для проведения последовательных пассажей и титрации вируса [8].

Результаты исследований. На рисунке представлена электрофореграмма продуктов амплификации фрагментов ДНК парвовируса из образцов проб: 1 – культура фибробластов эмбрионов гусей; 2, 3, 4 – культуральная вирусосодержащая жидкость инактивированная 0,2% ЭИ в течение 24, 36 и 48 часов соответственно; 5 – культуральная вирусосодержащая жидкость инактивированная 0,15% ЭИ в течение 24 часов; 6 – культуральная вирусосодержащая жидкость инактивированная 0,15 % ЭИ в течение 48 часов; 7,8 – положительный и отрицательный контрольные образцы. В случае наличия генома парвовируса размер ампликона составил 539 п.н.

Контроль инактивации проводили молекулярно-генетическими методами (ПЦР) и параллельно путем последовательных пассажей в культуре фибробластов эмбрионов гусей. При внесении инактивированного 0,2% этиленимином вируса в культуру клеток не наблюдалось цитопатического действия, в то время как при использовании ЭИ в концентрации 0,15% вирус инактивировался полностью только через 48 часов (табл.), что соответствует результатам полимеразной цепной реакции, представленным на электрофореграмме.

Контроль эффективности инактивации путем проведения последовательных пассажей в культуре клеток занимает более 30 дней, в то время как результаты ПЦР известны уже через 8 – 10 часов, что делает перспективным использование полимеразной цепной реакции в качестве контроля эффективности инактивации вакцин в целом (при использовании инактиванта, действующего на нуклеиновые кислоты вируса), а также при производстве инактивированной вакцины против вирусного энтерита гусей (болезни Держи) в частности.

Выводы

1. Результаты, полученные с использованием полимеразной цепной реакции в качестве контроля эффективности инактивации парвовируса этилени-

мином, подтверждаются путем проведения последовательных пассажей в культуре клеток эмбрионов гусей.

2. Контроль эффективности инактивации с помощью полимеразной цепной реакции при использовании этиленимина в качестве инактиванта позволяет получить результаты в течение 8-10 часов, что дает возможность максимально сократить время, а также снизить трудо- и материалозатраты при производстве вакцин.

3. Этиленимин в концентрации 0,2% полностью инактивирует парвовирус в течение 24 часов, в то время как в концентрации 0,15% – только через 48 часов.

В статье показана эффективность использования полимеразной цепной реакции как метода контроля инактивации парвовируса этиленимином при изготовлении вакцины против вирусного энтерита гусей. Результаты, полученные с использованием полимеразной цепной реакции, подтверждены путем проведения последовательных пассажей в культуре клеток эмбрионов гусей. Применение молекулярно-генетических методов позволяет сократить время на проведение контроля инактивации в 72 раза в сравнении со стандартным методом в культуре клеток.

Вирусный энтерит гусей, парвовирус, полимеразная цепная реакция, инактивация, этиленимин

In the article is shown the efficiency of the polymerase chain reaction as a method of control inactivation of parvovirus by ethylenimine in the making of vaccines against viral enteritis of geese. The results obtained using the polymerase chain reaction, confirmed through serial passages in cell culture embryos geese. The application of molecular genetics techniques makes possible to shorten control inactivation to 72 times, compared with the standard method in cell culture.

Viral enteritis of geese, parvovirus, polymerase chain reaction, inactivation, ethylenimine



Литература

1. Використання живих та інактивованих вакцин для профілактики вірусних хвороб птиці / В.Борисов, О.Борисов, С.Старов [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 1999. – №1. – С.10-11.
2. Йенс-Петер Г. Вирусные вакцины, полученные из клеток с низкими уровнями остаточной клеточной ДНК. Евразийский патент № 200801221 / Г.Йенс-Петер, К.Хольгер. – М.: Евразийская патентная организация, 2010. – 20 с.
3. Волощук Т.П. Алкилирование компонентов нуклеиновых кислот этиленимином и его производными. Алкилирование гомополинуклеотидов и ДНК / Т.П.Волощук, Ю.В.Пацковский, А.И.Потопальский // Биорганическая химия. – 1999. – Т.25, №6. – С. 464-473.
4. Расщепление вирусного генома с помощью искусственных рибонуклеаз – новый способ инактивации РНК-содержащих вирусов / Е.П.Гончарова, М.П.Ковпак, Е.И.Рябчикова [и др.] // Доклады академии наук. – 2009. – Т.427, № 6. – С. 840-843.
5. Сергеев В.А. Вирусные вакцины / В.А.Сергеев. – К.: Урожай, 1993. – 368 с.
6. Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А.Сергеев, Е.А.Непоклонов, Т.И.Алипер. – М.: Библиотека, 2007. – С. 206-223.
7. Способ технологического контроля полноты инактивации убитых вакцин при использовании в качестве инактиватора сернистой меди. Патент Российской Федерации № 2089893 / С.Ж.Цыбанов, В.И.Жестерев, Н.И.Закутский [и др.]. – М., 1997.
8. Сюрин В.Н. Руководство по ветеринарной вирусологии / В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1966. – 687 с.
9. Effective inactivation test of inactivated hepatitis A vaccine using integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction / J.Zhou, G.Ji, J.N.Wen [et al.] // Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology. – 2008. – V.22 (6). – P.488-491.
10. General Requirements for Inactivated Mammalian Vaccines (GRIMV) Directive 81/852/EEC III/3181/91.
11. Hemminki K. Reactions of beta-propiolactone, beta-butyrolactone and gamma-butyrolactone with nucleic acids / K. Hemminki // Chem. Biol. Interact. – 1981. – V. 34. – P. 323-331.
12. Immunogenicity of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated infectious bursal disease virus in broiler chicks / M. Habib, I. Hussain, H. Irshad [et al.] // J.Zhejiang Univ Science B. – 2006. – V. (8). – P.660-664.
13. Method for inactivating a virus. – U.S. patent 5891705 / Horowitz [et al] // U.S.A. – 1999.
14. Mowat N. Vaccine manual: The production and quality control of veterinary vaccines for use in developing countries / N. Mowat, M. Rweyemamu // Rome (Italy): FAO. – 1997. – 434 p.