УДК 619: 578:835.1:578.832.1:619.5

ОЧИСТКА І КОНЦЕНТРУВАННЯ ВІРУСУ ГРИПУ ШТАМІВ А/КУРКА/СИВАШ/02/05, А/КАЧКА/УКРАЇНА/63 ТА А/МАРТИН/АСТРАХАНЬ/227/84

Стегній Б.Т., Музика Д.В., Майорова К.Ф., Усова Л.П., Воскобойнік М.А.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Метою досліджень було визначення оптимальних умов очистки та концентрування вірусу грипу штамів А/курка/Сиваш/02/05, А/качка/Україна /63 та А/мартин/Астрахань/227/84.

Грип птиці – особливо небезпечне вірусне захворювання, яке відноситься до числа інфекцій, які викликають непередбачувані, надзвичайно загрозливі епідеміологічні та епізоотичні ситуації, і є на сьогодні актуальною проблемою для медицини і ветеринарії [1]. Грип птиці віднесено до списку особливо небезпечних захворювань МЕБ [2].

На даний час грип посідає важливе місце серед інфекційних хвороб птиці. Найбільшу розповсюдженість в природі, а також більше епідеміологічне та епізоотичне значення мають віруси грипу А, які інфікують різні види птиці і ссавців [3, 4, 5].

За останні 10 років не тільки збільшилась кількість спалахів грипу, але і кількість залученої птиці та матеріальні витрати на боротьбу з захворюванням. З огляду на це стає зрозумілим зростання необхідності моніторингу цієї хвороби та розробки сучасних засобів діагностики [6].

Основними засобами діагностики вірусу грипу птиці в Україні згідно стандарту МЕБ є такі методи як реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція дифузної преципітації (РДП). Важливе значення мають також реакція нейтралізації (РН), іммуноферментний аналіз (ІФА), та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [2]. Тому розробка вітчизняних тест-систем є пріоритетним напрямком досліджень.

Одним з найбільш суттєвих моментів приготування діагностикумів є одержання очищеної та концентрованої суспензії вірусу [7].

Метою досліджень було визначення оптимальних умов очистки і концентрування вірусу грипу А/курка/Сиваш/02/05 (H5N1), А/качка/Україна /63 (H3N8) та А/мартин/Астрахань/227/84 (H14N5), які можуть бути використані в якості антигену для серологічних реакцій, а також для отримання гіперімунних сироваток крові.

Матеріали і методи. У роботі були використані штами вірусу грипу А:

- А/курка/Сиваш/02/05 (H5N1);
- А/качка/Україна /63 (H3N8);
- А/мартин/Астрахань/227/84 (H14N5).

Освіження штамів вірусу грипу А проводили на 9-10 курячих СПФ-ембріонах (КЕ-СПФ). Після відбору екстраембріональної рідини (ЕЕР), при перевірці біологічної та гемаглютинаційної активності її використовували в якості матрової розплодки. Для накопичення вірусної маси

використовували 9-11 добові КЕ, зараження ембріонів проводили в алантоїсну порожнину в дозі 0,1-0,2 см^3. Інкубацію інфікованих КЕ проводили протягом 3 діб за температури 37^{0}С. Інактивацію проводили формальдегідом у кінцевій концентрації 0,5% протягом 72 годин [2]. Перевірку повноти інактивації проводили трьома сліпими пасажами. Матеріал зберігали за температури 4^{0}С.

Антиген концентрували ПЕГ- 6000, освітлювали низькошвидкісним центрифугуванням при 6 000 об./хв.. Далі проводили ультрацентрифугування за допомогою центрифуги Eppendorf 5415R, наносячи вірусний матеріал на 30 % сахарозу за температури 4 ^{0}С. В отриманих зразках антигенів була визначена концентрація білка за Бредфордом. Рідину, що містила вірус, розливали по флаконам по 0,5 см^3 і зберігали за температури мінус 20 ^{0}С. Активність антигенів перевіряли в РГА.

Результати досліджень. Очищення проводили за наступною схемою:

Низькошвидкісне центрифугування (осадження клітинного детриту):

– штам А/курка/Сиваш/02/05 (6000 об./хв. протягом 20 хв. за температури 5^{0}С);

– штам А/качка/Україна/63/ (4000 об./хв протягом 40 хв. за температури 5^{0}С);

– штам А/мартин/Астрахань/227/84 (2000 об./хв. протягом 10 хв. за температури 5^{0}С) на низькошвидкісній центрифузі Eppendorf centrifuge 5810 R. Далі антиген концентрували поліетиленгліколем (ПЕГ- 6000), додаючи його розчин до кінцевої концентрації 7 %. Після цього проводили центрифугування за температури (0-5)єС:

– штам А/качка/Україна/63 по 20 хв. при 12000 об./хв.;

– штам А/мартин/Астрахань/227/84 по 40 хв при 4000 об./хв.;

Осад розчиняли у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4 у об’ємі 1:10 до вихідного. Далі проводили ультрацентрифугування на центрифузі Eppendorf centrifuge 5415 R, наносячи вірусний матеріал на 30 % сахарозу

– штам А/курка/Сиваш/02/05 (за температури 4 ^{0}С при 16100g протягом 3 годин);

– штами А/качка/Україна/63 та А/мартин/Астрахань/227/84 (за температури 9 ^{0}С при 12000 об./хв. протягом 4 годин).

Вірусний осад розчиняли у фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4 в об’ємі 1:10 до вихідного.

З метою визначення оптимальної методики очистки і концентрування вірусів грипу перед початком та після очищення вірусної маси були відібрані зразки в об’ємі 1см^3 для визначення білка за Бредфордом та активності антигенів в РГА.

Результати визначення концентрації білку та активності антигенів в РГА наведені в таблицях 1, 2.

Як видно з таблиці 1, після очищення і концентрування вірусів кількість білка у обох зразках збільшилась. При цьому в H3N8 – на 326 мкг/см^3, а в H14N5 – на 140 мкг/см^3, що свідчить про доцільність використання режимів центрифугування, застосованих для штаму А/качка/Україна/63 (H3N8).

Таблиця 1 – Результати визначення білка у вірусній масі за Бредфордом

Штам	*Кількість білка, мкг/см³*	
	До очищення	*Після очищення і концентрування*
А/курка/Сиваш/02/05 (H5N1)	не визначали	305
А/качка/Україна/63 (H3N8)	1024	1350
А/мартин/Астрахань/227/84(H14N5)	750	890

Таблиця 2 – Результати визначення активності антигенів в РГА

Штам	*Титр в РГА, log_2*	
	До очищення	*Після очищення і концентрування*
А/курка/Сиваш/02/05 (H5N1)	10	15
А/качка/Україна/63 (H3N8)	13	19
А/мартин/Астрахань/227/84 (H14N5)	8	11

За результатами визначення активності антигенів в РГА (таб. 2) можна зробити висновок, що після очищення титри антигенів збільшились на 5 log_2, 6 log_2 та на 3 log_2 відповідно. Це також свідчить на користь режимів центрифугування, застосованих для штаму А/качка/Україна/63 (H3N8).

Висновки. 1. Таким чином, проведені дослідження свідчать, що очищення і концентрування вірусу грипу з використанням ПЕГ-6000 і 30% сахарози при центрифугуванні з більшою швидкістю дозволяє отримати концентрат з більш високою антигенною активністю.

2. Встановлено наявність прямої кореляції між активністю вірусу до і після очищення та концентрування, тобто вірусвміщуюча рідина з високою активністю дозволяє отримати більше зростання титру при отриманні антигену.

2. Відпрацьований нами режим очищення і концентрування вірусу грипу дозволяє отримувати високоспецифічний антиген, придатний для створення діагностичних тест-систем для виявлення антитіл до вірусу грипу в РЗГА, РДП та ІФА.

Список літератури

1. Музыка Д.В., Стегний Б.Т., Вербицкий П.И., Ямникова С.С., Безрукавая И.Ю. Серологический мониторинг диких водоплавающих птиц в отношении гриппа А в Украине [Текст] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. №84. – Х., 2004.- С. 503-507. ***2.*** Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [Text]/ Office International desepisootic (OIE), 2008. ***3.*** Ямникова С.С., Федякина И.Т., Ломакина Н.Ф. и др. Ситуация по гриппу среди диких и сельскохозяйственных птиц на территории России (2000-2002 гг.) [Текст] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. №82. – Х., 2003. - С. 738-741. ***4.*** Бессарабов Б.Ф. Практикум по болезням птиц [Текст] / Б.Ф. Бессарабов [и др.]. – М.: Колос, 2005. – 200 с. ***5.*** Довідник з хвороб птиці [Текст] / За ред. В.В. Германа, П.І. Вербицького, Б.Т. Стегнія. –Х., 2002. – 296 с. ***6.*** Ямникова С.С., Виткова О.Н., Калмыков М.В. и др. Стратегия и тактика борьбы с гриппом на различных

этапах эпидемиологического процесса [Текст] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. №82. – Х., 2006. - С. 307-312. 7. Мейхи Б. Вирусология. Методы [Текст] / Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – С. 301.

PURIFICATION AND REDUCTION OF VIRUS INFLUENZA STRAINS A/CHICKEN/SIVASH/02/05, A/CHICKEN/UKRAINE/63 AND A/MARTIN/ASTRACHAN/227/84

Stegniy B.T., Muzyka D.V., Mayorova K.F., Usova L.P., Voskoboynik M.A.
National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

The purpose of our investigations was to determine optimal conditions of purification and reduction of virus influenza strains a/chicken/Sivash/02/05, a/chicken/Ukraine/63 and a/martin/Astrachan/227/84.

УДК 591.85:619:616.99

ВПЛИВ ТОКСОКАРОЗНОЇ ІНВАЗІЇ НА ЧАСТОТУ ВИЯВЛЕННЯ МІКРОЯДЕР В ЕРИТРОЦИТАХ БІЛИХ НЕЛІНІЙНИХ ЩУРІВ У МІКРОЯДЕРНОМУ ТЕСТІ

Стибель В.В, Прийма О.Б.

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Проведені нами дослідження показали, що інвазія Toxocara canis та їх метаболіти викликають цитогенетичні порушення в еритроцитах білих нелінійних щурів.

Актуальною проблемою сьогодення, що має медико–санітарне значення є захворювання токсокароз спричинене збудником Toxocara canis. Проблема токсокарозу є важливою як для гуманної, так і ветеринарної медицини. Складність у вирішенні питань профілактики зараження людей і тварин даним гельмінтозом пов'язана з відсутністю надійних методів діагностики цієї інвазії у м'ясоїдних, а також людей, викликаної міграцією личинок нематод.

Нині існуючі методи гельмінтоовоскопії дозволяють діагностувати лише кишкову форму токсокарозу.

Діагностика найбільш тяжкої та складної міграційної стадії, як показують узагальнені матеріали джерел літератури, потребує розробки новітніх методів діагностики, зокрема із застосуванням цитогенетичних досліджень.

Цитогенетичні методи є найчутливішими до встановлення мутагенного впливу чинників навколишнього середовища та дозволяють реєструвати зміни на хромосомному і геномному рівнях організації спадкової інформації [1]. Одним із цитогенетичних методів експрес-оцінки генетичної небезпеки ксенобіотиків in vivo у ссавців є мікроядерний тест [4]. Останнім часом цей метод отримав широке застосування у гуманній та ветеринарній медицині для визначення мутагенної дії чинників навколишнього середо-