

THE COMMISSION PRODUCTION TESTING OF DOMESTIC TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO AVIAN INFLUENZA VIRUS A SUBTYPES H1-H14 IN THE HEMAGGLUTINATION REACTION DELAY

Stegniy B.T., Mayorova K.F., Muzyka D.V., Stegnyy M.Yu.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine», Kharkiv

Ushkalov V.A., Babkin M.V., Blotskaya O.F.

The State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Dedok L.A.

State Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv

The results of interdepartmental commission production testing of a biological product «Test system for the detection of antibodies to influenza A virus subtypes H1–H14 in the hemagglutination reaction delay» the development and production of NSC «IECVM». Were determined that this biological product is high, specific and safe.

УДК 57.043;578.71

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ТА АТЕНУЙОВАНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА

Стегній М.Ю.

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

Хвороба Марека (ХМ) – це висококонтагіозне захворювання курей та індичок з двома формами перебігу: перша – класична, характеризується поразкою периферичної й центральної нервової системи; друга – гостра, характеризується лейкозом і утворенням лімфоїдних пухлин.

До застосування вакцинопрофілактики ХМ наносила величезний економічний збиток у всіх країнах світу з розвиненим птахівництвом. Вірусна природа хвороби була доведена в 1967 році. Збудник ХМ – вірус хвороби Марека (ВХМ) належить до сімейства α -герпесвірусів [1, 2, 4].

Він має три серотипи. До першого серотипу відносяться віруси, здатні викликати лімфоми у птахів; а також атенувані його варіанти. Природно ослаблені неонкогенні віруси ХМ другого серотипу володіють протективними властивостями, тому використовуються як посилюючі імунну відповідь компоненти в бівалентних вакцинах.

Третій серотип ВХМ представлений антигенно спорідненими не онкогенними вірусами герпесу індичок (ВГІ). Вірусні частки мають діаметр 85–100 нм, але зустрічаються й більші віріони з оболонкою, розміром 150–170 нм, які можуть містити або не містити електронно-щільний нуклеоїд.

Віріони розташовуються здебільшого в ядрі клітин. У препаратах епітелію пір'яних фолікул присутні великі безструктурні частки розміром 275–400 нм у діаметрі [1].

Вірус має складну антигенну структуру, яка представлена шістьма антигенами. Найбільш важливі з них А, В, С-антигени. А-антиген містить всі патогенні штами. Атенуація вірусу пов'язана із втратою цього антигену. А-антиген загальний для всіх штамів вірусу хвороби Марека. Між штамми, виділеними від індичок і курчат, відзначена відмінність по декількох другорядних антигенах.

Гемаглютинуючі властивості вірусу не встановлені. Штами відрізняються за характером ЦПД, за активністю репродукції в культурі клітин і морфологією бляшок, кількістю позаклітинного вірусу.

При вивченні антигенної структури вірусу необхідно враховувати ту обставину, що штамми не повинні пасажуватися більше за 10 пасажів, оскільки в цьому випадку зникає А-антиген. За А-антигеном віруси герпесу індичок є родинними, але не ідентичними.

Репродукція вірусу починається в ядрі ураженої клітини, потім вірус здобуває білкову оболонку при переході в цитоплазму, де розмір віріонів збільшується. Морфогенез вірусу в клітинах сприйнятливих птахів може бути завершеним і незавершеним. Чутливими до вірусу біологічними системами є курчата, курячі ембріони, культури клітин органів курячих ембріонів. У пухлинних клітинах інфікованого птаха вірус може бути інтегрований із клітинним геномом, у клітинах бурси Фабріціуса – у вигляді неповного вірусу, представленого специфічним антигеном, а в клітинах пір'яних фолікулів – у вигляді віріонів із зовнішньою оболонкою, патогенного та стійкого до впливів зовнішнього середовища.

Було встановлено, що вірус може бути в клітині у двох формах: клітинно-асоційованій та вільній від інтеграції з будь-якими клітинними структурами.

Через 5–7 діб після інфікування з'являються округлі клітини різної форми. Потім утворюються рефракільні клітини й часто багатоядерні гігантські клітини з еозинофільною гранулярною цитоплазмою й внутрішньоядерними включеннями типу А.

Мета роботи. Визначити оптимальні технології кріоконсервування та зберігання виробничих штамів та атенуованих ізолятів вірусу хвороби Марека.

Матеріали та методи. Для напрацювання біомаси ВХМ використовували первинно – трипсинізовану клітинну культуру фібробластів ембріонів курей (ФЕК), отриману з 10–11-добових курячих ембріонів. Культивування клітин здійснювали за стандартною методикою [5, 7] у суміші рівних обсягів середовища 199 та Ігла з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ). Зараження клітинного моношару проводили за стандартною вірусологічною методикою [5]. Культивування інфікованих вірусом клітин здійснювали у підтримуючому середовищі того ж складу, але з 2 % сироваткою (ВРХ). У роботі використовували виробничий штам SBG (*Gallid herpesvirus type 2*) вірусу другого серотипу, атенуований штам NR8/08 першого серотипу, атенуовані ізоляти 3/11; 5/11ВХМ першого серотипу (*Gallid herpesvirus type 1*) хвороби Марека. Усі перелічені віруси з колекції лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ». Збереженість системи вірус-клітина контролювали за методом суправітального фарбування трипановим синім у камері Горяєва [10]. Для підвищення схоронності та життєздатності кріоконсервованих клітин застосовували кріопротектор діметилсульфід у кінцевих концентраціях від 2 до 10 %. Кріоконсервування інфікованих клітин здійснювали у кріопробірках фірми Nunk об'ємом 4,5 см³ на програмному заморожувачі виробництва СКТБ і ОП ІПК і К НАН України. Інфекційну активність ВХМ визначали титруванням на первинній культурі клітин фібробластів ембріонів курей (ФЕК), у культуральних флаконах ємністю 50 см³. При цьому зараження проводили в об'ємі 0,5 см³ кожним десятикратним розведенням вірусу на 4–5 флаконів моношару клітин за стандартною методикою [5]. Після цього інфікова-

Розділ 9. Біотехнологія

ну культуру інкубували за температури 39°C упродовж 4–6 діб зі зміною підтримуючого середовища. Облік ЦПД здійснювали на 3–4 (первинна генерація фокусів) та 6 добу після інфікування (вторинна генерація), після чого видаляли підтримуюче середовище, моношар фіксували 3 % розчином оцтової кислоти та фарбували 1 % водним розчином амідового чорного та підраховували кількість фокусів, індукованих вірусом. Титр інфекційної активності визначали по середньому числу фокусів, що утворилися (ФУО), використовуючи формулу:

$$T=(X\phi_1+X\phi_2+X\phi_3)/N\phi P$$

де: T – титр інфекційної активності вірусу;

XФ – кількість фокусів, підрахованих у кожному матраці із клітинами, зараженими певним розведенням вірусу;

P – розведення;

N – кількість використаних для підрахунку ємностей.

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили за методом негативного контрастування за допомогою солей фосфатовольфрамислової кислоти (ФВК), що створює однорідний електронно-непроникний фон, на якому такі об'єкти, як віріони чітко виділяються в деталях.

Результати досліджень. Як показали нечисленні дослідження, можливості кріоконсервування інфікованих вірусом клітин для цілей біотехнології [6], розробка оптимальних способів цього процесу ускладнюється через підсумовування кріопошкоджень системи вірус-клітина та ушкоджень, отриманих клітинами у процесі внутрішньоклітинної репродукції вірусу. Істотне значення при цьому має швидкість з якою здійснюють заморожування, кінцева температура кріоконсервування й наступного зберігання, вибір кріопротектору та відпрацювання оптимальної концентрації його застосування. Аналіз даних літератури показав, що для кріоконсервування клітинних ліній, що переживаються, з успіхом застосовують у якості кріопротектору діметилсульфоксид або самостійно, або як компонент у суміші кріопротекторів [3, 8].

Штам SBG і атенуйований штам NR8/08 першого серотипу, атенуйовані ізоляти 3/11; 5/11BXM першого серотипу вірусу хвороби Марека активно розмножувалися у первинній культурі клітин курячих ембріонів (КЕ), проявляючи при цьому цитопатичний ефект у вигляді утворення характерних фокусів. Після явного прояву цитопатичного ефекту моношар знімали зі скла версен-трипсиновою сумішшю з наступним додаванням кріозахисного середовища. Потім розфасовували у кріопробірки та кріоконсервували на програмному заморожувачі із застосуванням швидкої (швидкість 300–400° за хвилину, шляхом прямого занурення в рідкий азот) і двоступінчатої програм: від температури плюс 4 °С до мінус 30 °С зі швидкістю 1° за хвилину; від мінус 30 °С до мінус 70 °С зі швидкістю 5–10° за хвилину з наступним зануренням у рідкий азот (мінус 196 °С) [9].

У якості середовища для кріоконсервування використовували: підтримуюче середовище; підтримуюче середовище з додаванням 10 % діметилсульфоксиду; живильне середовище 199 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду. Ефективність застосовуваних режимів кріоконсервування кріозахисних середовищ оцінювали за схоронністю клітин і інфекційною активністю вірусу. У тому випадку, якщо схоронність клітин не перевищувала 30 %, дані кріозахисні суміші й режими заморожування не вважали задовільними. Вихідна концентрація інфікованих вірусом клітин у кріопробірках становила від 5 до 6 млн/см³.

Результати проведених експериментів показали, що застосування швидкої (швидкість 300–400° за хвилину) програми кріоконсервування з використанням підтримуючого середовища й підтримуючого середовища з додаванням 10 % діметилсульфоксиду не забезпечувало схоронності інфікованих клітин вище 30 %. Максимальну схоронність інфікованих клітин (33,7 %) спостерігали при кріоконсервуванні із застосуванням швидкої програми та консервуючого середовища, що включає живильне середовище 199 і середовище з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду. Застосування діметилсульфоксиду в концентрації 15 % у складі того ж кріозахисного середовища викликало тенденцію зниження інфекційної активності вірусу.

Основою профілактики ХМ є вакцинація бівалентними та полівалентними гетерологічними живими вакцинами [4].

Застосування двоетапного режиму заморожування й середовища консервування, що включає живильне середовище 199 з додаванням 10 % інактивованої сироватки крові (ВРХ) і 10 % діметилсульфоксиду, дозволяє одержати належну схоронність інфікованих клітин, що забезпечує інфекційну активність штамів, які можуть використовуватися як компоненти полівалентних гетерологічних атенуйованих вакцин проти ХМ.

Визначення впливу терміну зберігання на морфологію та інфекційні властивості досліджуваних штамів та ізолятів показало, що виробничий штам SBG зберігав титри інфекційної активності впродовж тридцяти шістьох місяців спостереження за умов збереження у рідкому азоті (мінус 196 °С). При цьому зберігалися типова ультраструктура та морфологія віріонів BXM (Рис. 1).

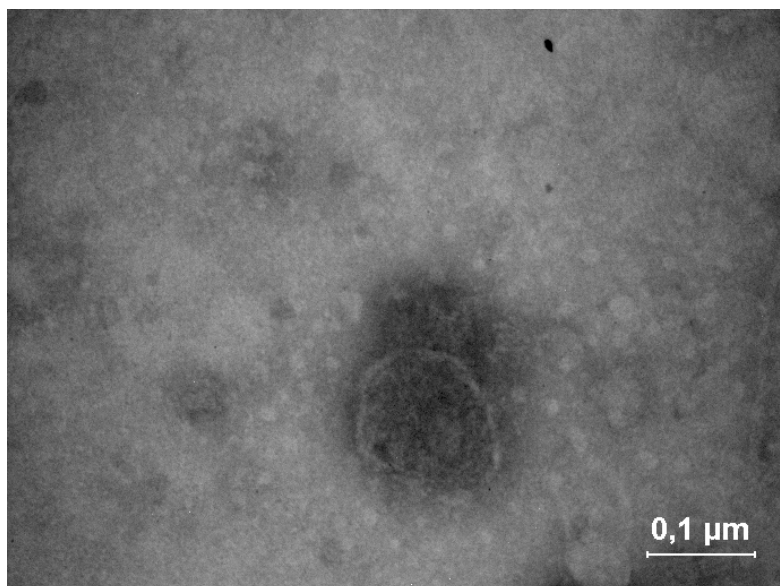


Рис. 1. Ультраструктура та морфологія BXM штаму SBG, який зберігався за температури мінус 196 °С

Атенуйований ізолят ВХМ першого серотипу 3/11, який було виділено від загиблого курча у 2011 році, зберігав незмінними титри інфекційної активності впродовж 12,5 місяців зберігання за температури рідкого азоту (термін спостереження). Необхідно відмітити більшу криостабільність атенуйованого ізоляту 3/11 у порівнянні із меншою його криостабільністю на початку клонування. Електронно-мікроскопічні дослідження ізоляту 3/11 показали наявність типових віріонів у первинній культурі фібробластів курячих зародків (Рис. 2).

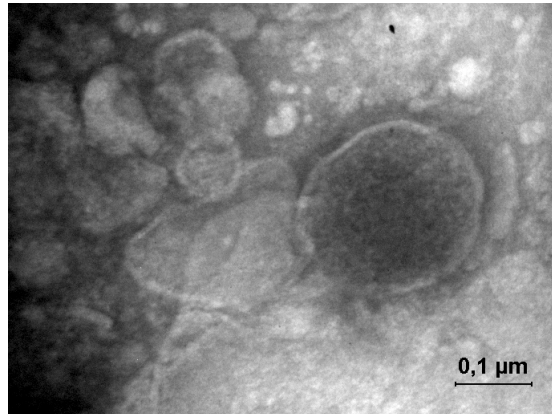


Рис. 2. Ультраструктура та морфологія віріонів ізоляту 3/11 ВХМ першого серотипу, який зберігався за температури мінус 196°C.

Атенуйований ізолят ВХМ першого серотипу 5/11 зберігав незмінними титри інфекційної активності впродовж 14 місяців зберігання за температури рідкого азоту (термін спостереження). Морфологія та ультраструктура популяції віріонів, що збереглися при цьому показана на рисунку 3.

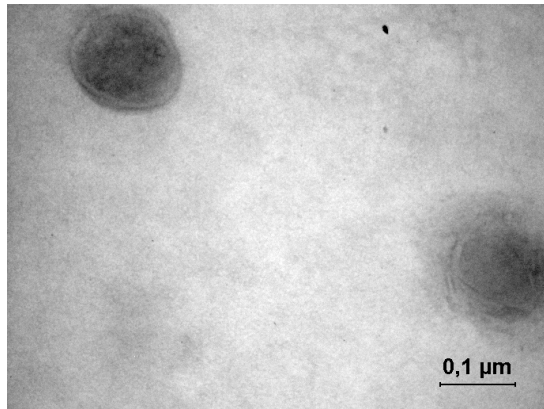


Рис. 3. Ультраструктура та морфологія віріонів ізоляту 5/11 ВХМ першого серотипу, який зберігався за температури мінус 196 °С

Атенуйований штам ВХМ першого серотипу NR8/08, який було отримано нами шляхом перемезованих пасажів на первинних і перещеплюваних культурах клітин фібробластів (КЕ) (Патент України на корисну модель № 61006), зберігався за умов рідкого азоту (мінус 196 °С) упродовж 62 місяців. При цьому титри інфекційної активності залишилися незмінними на вихідному рівні. Морфологія та ультраструктура популяції віріонів, що збереглися при цьому показана на рисунку 4.

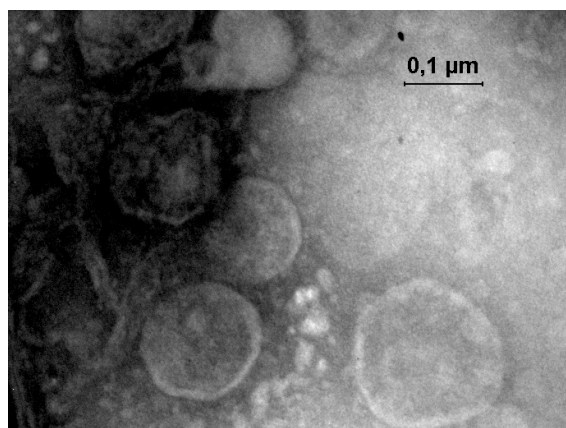


Рис. 4. Ультраструктура та морфологія віріонів штаму ВХМ першого серотипу NR8/08, який зберігався за температури мінус 196 °С

Висновок. Таким чином, досліджені нами штами та атенуйовані ізоляти ВХМ, які можуть використовуватись у подальшому як компоненти полівалентної вакцини проти ХМ зберігали ультраструктуру та титри інфекційної активності на вихідному рівні впродовж усього терміну зберігання за умов рідкого азоту.

Список літератури

1. Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин [и др.]. – М.: ВНИТИБП, 1998. – 721 с. 2. Инфекционная патология животных [Текст]. В 2 т. / А.Я. Самуйленко [и др.]. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. – Т. 1. – 1911 с. 3. Криоконсервирование клеточных суспензий [Текст] / А.А. Цуцаева [и др.]. – К.: Наукова думка, 1983. – 240 с. 4. Лукина, В.А. Современное состояние и перспективы вакцинопрофилактики болезни Марека [Текст] / В.А. Лукина, Б.В. Соловьёв, Н.Н. Быкова // Научные основы производства вет. биол. препаратов: тез. докл. – Щёлково, 2000. – С. 6–8. 5. Лярс-ки, З. Диагностика вирусных болезней животных [Текст] / З. Лярска; пер. с пол. Т.Г. Орловой, Я.С. Ляндесберга; под ред. В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1980. – 399 с. 6. Стегний, М.Ю. Особенности криоконсервирования клеток, инфицированных вирусами [Текст] / М.Ю. Стегний, И.Л. Дикий, Б.Т. Стегний // Экспериментальна і клінічна медицина. – 1999. – № 2. – С. 111–113. 7. Сергеев, В.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии [Текст] / В.А. Сергеев, Ю.А. Собко. – К.: Урожай, 1993. – 151 с. 8. Стегний, Б.Т. Сравнительное изучение криозащитного эффекта различных криопротекторов для культур и тканей [Текст] / Б.Т. Стегний // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докл. науч. конф. – Владимир, 1986. – С. 50–52. 9. Декларационный патент на полезную модель № 4912 Украина, МПК С12N 7/00, С12N 1/04, С12R 1/93. Способ консервирования вируса болезни Марека [Текст] / М.Ю. Стегний, Б.Т. Стегний, О.В. Заремба; IEKBM. – № 20040503887; заявл. 24.05.2005; опубл. 15.02.2005, Бюл. №2. – 4 с. 10. Фрешни, Р. Культура животных клеток: методы [Текст] / Р. Фрешни. – М.: Мир, 1989. – 332 с.

BIOLOGICAL ASPECTS OF CRYOPRESERVATION AND STORAGE OF SEED STRAINS AND ATTENUATED ISOLATES OF MAREK'S DISEASE VIRUS

Stegniy M. Yu.

National Scientific Centre "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkov

The optimal cryopreservation and storage technology of seed strains and attenuated isolates of Marek's disease virus were selected. Ex strains and isolates of the pathogen, which can be used as components in future polyvalent vaccine against MD kept ultrastructure and titers of infectious activity at baseline levels throughout the whole period of storage under conditions of liquid nitrogen.

УДК 636.09:616.98:615.371:[57.063.8:579.852.1]

ПІДҐРУНТЯ ДЛЯ ЗАПРОВАДЖЕННЯ РЕФЕРЕНС-ПРЕПАРАТУ ВАКЦИНИ ПРОТИ СИБІРКИ ТВАРИН

Ушкалов В.О., Мачуський О.В., Бабкін М.В., Виговська Л.М., Ковтун В.А.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Кошельник В.Г.

Херсонське державне підприємство-біологічна фабрика, м. Херсон

Криничний О.М.

Головне управління ветеринарної медицини в Херсонській області, м. Херсон

Ідея створення препаратів, застосування яких створювало б не сприйнятливості організму до інфекційних хвороб, зародилася у людства дуже давно, але її втілення стало можливим лише у XVIII ст. після створення вакцини проти віспи [1].

Toussaint встановив, що вівці не хворіють сибіркою, якщо їм попередньо підшкірно ввести дефібриновану кров, яка містить бацили та була прогріта протягом 10 хвилин за температури 55 °С [2]. Луї Пастер надав перевагу іншому шляху отримання протисибіркових вакцин, який він вже застосовував для ослаблення збудника холери курей, але стало зрозумілим, що мікроби антраксу не слабнуть від дії атмосферного повітря, а перетворюються в спори [3]. У 1881 році Пастер повідомив, про розробку іншого методу отримання вакцини: вірулентну культуру, виділену з трупу тварини, що загинула від сибірки, засівають до курячого бульйону та культивують в термостаті за температури 42–43 °С для аттенуації [4]. Використання препаратів, виготовлених таким шляхом передбачало почергове підшкірне уведення I-ї та II-ї вакцини. Далі є так зване комбінаційне, або симультанне, щеплення, коли вводять разом II-у вакцину та гіперімунну сироватку. А. Безредьком зі співавторами було розроблено метод внутрішньошкірного введення вакцин, при цьому автори вказували на більш високу ефективність даного методу [1]. Проблемою профілактики антраксу науковці займаються вже понад століття, але не дивлячись на це, сьогодення пред'являє нам нові виклики та проблеми.

Особлива увага до збудника сибірки обумовлена його здатністю викликати тяжкі захворювання та загибель тварин і людей, тривалий час зберігатися в зовнішньому середовищі без втрати патогенних властивостей, а також можливістю використання *Bacillus anthracis* в якості біологічної зброї або засобу біотероризму [4, 5, 6].

Не зважаючи на те, що в Україні зареєстровано дві вакцини проти сибірки тварин, ефективність яких доведена застосуванням упродовж майже 20 років, глобальні виклики стосовно біобезпеки, біозахисту та продовольчої безпеки обґрунтовують проведення наукових досліджень стосовно підвищення рівня ефективності засобів імунізації.

Для проведення профілактичної імунізації найбільш широко у світі застосовуються живі вакцини із штамів мікроорганізмів, що втратили здатність до капсулоутворення. Так, у КНР використовується вакцина з авірулентного штаму Langzhou A16R. У країнах СНД користувалися та користуються такими безкапсульними штамми сибірки: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВ-ВиМ, *Bacillus anthracis* СБ та *Bacillus anthracis* К-79Z. Проте, за даними ОІЕ, у більшості країн світу застосовуються препарати із штаму *B. anthracis* Sterne 34F2, що обумовлено сукупністю чинників, зокрема – більш вираженої імуногенності та рівня безпечності для тварин (Plotkin S.A., 2011). В Україні штамми, що рекомендовані ОІЕ і FAO (Продовольчою та сільськогосподарською організацією Об'єднаних Націй) для виготовлення вакцин проти сибірки – *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 та *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВИМ – не використовуються. Тобто постає питання нормативного регулювання та методологічної основи для контролю якості протисибіркових вакцин згідно міжнародних вимог. Порівняльний аналіз національних і міжнародних нормативно-правових документів (НД) у галузі розробки, виробництва та контролю якості препаратів для профілактики сибірки з метою оптимізації контролю їх якості