

ВІРУСОЛОГІЧНА ІНДИКАЦІЯ ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ ФІБРОБЛАСТІВ (ФЕК), ДОСЛІДЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ТА ЇХ ЗБЕРІГАННЯ

Стегній М.Ю., Ворошилов І.С.

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

У природі дуже поширені вірусні хвороби птахів, які виявляють свою присутність, викликаючи специфічні захворювання серед сприйнятливих популяцій диких птахів. Для індикації та виділення вірусів використовуються спеціальні засоби та методи. Виявлення вірусного збудника дає можливість поставити відповідний діагноз на захворювання. Крім того, ізоляти збудників вірусних хвороб є самі по собі сировиною для виготовлення специфічних діагностичних і профілактичних препаратів. Для таких цілей віруси з початку виділяють (ізолюють), далі піддають ідентифікації та за допомогою спеціальних методів отримують штами, популяції з направленими властивостями. Штами вірусів за своїми імунобіологічними властивостями відрізняються один від одного та розподіляються на три основні групи. Першу групу складають штами вірусів, які призначені для референції, їх біологічні властивості, умовно, вважають типовими для даного виду збудника. У другу групу входять штами з біологічними властивостями, які близькі до природних і придатні для здійснення контролю імуногенності вакцинних препаратів. З таких же штамів можна готувати інактивовані вакцини або діагностичні препарати. Третю групу представляють штами вірусів, які зазнали певних змін в умовах самої природи або за допомогою дослідницьких впливів, і не володіють патогенністю по відношенню до сприйнятливих птахів, але мають імуногенні властивості. Віруси цієї групи частіше використовуються при виготовленні живих вакцинних препаратів. Їх можна застосовувати також для отримання діагностичних засобів.

Відомо, що популяції вірусів у процесі репродукції схильні до мінливості, тоді як технології виготовлення вакцинних і діагностичних препаратів вимагають застосування вірусних зразків зі стабільними біологічними показниками. Тому, для виключення ймовірної зміни необхідних стандартизованих біологічних властивостей популяції штамів вірусів підтримують та зберігають в умовах, які не стимулюють такі зміни або стимулюють в найменшій мірі. До таких умов відносяться криоконсервування та консервування шляхом сублімаційного висушування та наступного зберігання за температури мінус 20 °C та нижче.

Мета роботи – навести технологічні прийоми та біологічні параметри, що використовуються при виділенні, культивуванні та зберіганні вірусу хвороби Ньюкасла.

Матеріали та методи. Ідентифікацію виділеного вірусу проводили за допомогою реакції нейтралізації, поставленої на курячих ембріонах (КЕ) або в культурі клітин, а також реакції затримки гемаглютинації (РЗГА). Для цього виділений вірус у титрі 1000 ІД₅₀ у рівних об'ємних співвідношеннях змішували зі специфічною на вірус хвороби Ньюкасла сироваткою. Отриману суміш витримували протягом 60 хвилин за температури 37–38 °C і нею інокулювали один з чутливих біологічних субстратів. Паралельно, вірусом у зазначеній дозі, але без додавання сироватки заражали первинну культуру фібробластів (КЕ). За зараженим моношаром (ФЕК) спостерігали методом світової мікроскопії протягом 6–7 діб. При постановці (РЗГА) позитивним індикатором ХН є реакція аглютинації еритроцитів.

Вірус вважали ідентифікованим у разі загибелі курячих зародків, відсутності ЦПД у культурі клітин, заражених сумішшю випробуваного вірусу; при загибелі КЕ та наявності ЦПД у культурі клітин, розвитку захворювання у курчат, інфікованих випробуваним вірусом без додавання специфічної сироватки на хворобу Ньюкасла.

Культивування вірусу хвороби Ньюкасла проводили на курячих ембріонах і культурі клітин (ФЕК). Для культивування вірусу в (КЕ), вірус вводили в алантоїсну порожнину курячих ембріонів у дозі 0,3 см³, інкубували ембріони за температури 37–38 °C до 72 год. Заражені ембріони піддавали овоскопії через кожні 4–6 год., тільки що загиблі ембріони охолоджували за температури 4–8 °C. Охолоджені (КЕ) асептично розтинали, збирали екстраембріональну рідину (ЕЕР), очищали її центрифугуванням за 3000 об/хв. протягом 30 хвилин. Осад видалляли, а рідину, що залишилася, використовували як вірусну масу.

Для отримання культурального вірусу готували моношарову культуру клітин, висіваючи її в концентрації 200–300 тис. клітин/см³ в культуральні флакони, або готували суспензію клітин у концентрації 1000–1200 тис. клітин/см³ для культивування в суспензійному ферментері. Моношарову культуру клітин у культуральних флаконах, а також суспензію клітин у ферментері заражали вірусом хвороби Ньюкасла в дозі 0,001–0,01 ТЦД₅₀, які потім культивували за температури 37–38 °C до розвитку цитопатогенної дії в 80 % і більше площі моношару, дегенерації більше 90 % клітин в суспензії, культивованої в реакторі. Цитопатогенна дія вірусу в моношарі культури клітин проявляється через 24–48 годин. У момент максимального розвитку ЦПД, але без деструкції моношару культури клітин, сосуди з зараженою культурою клітин піддавали заморожуванню. Культуральну суспензію, інкубовану з вірусом у стані суспензії, піддавали заморожуванню при залишковій кількості живих клітин не більше 20 %. Після заморожування культуральної суспензії, у ній визначали інфекційні та гемаглютинуючі (ГА) титри вірусу. Вірус хвороби Ньюкасла накопичується в культурі клітин у титрах 10^{8,5}–10^{9,0} ТЦД₅₀/см³.

Для криоконсервування та подальшого зберігання відбирали вірусну суспензію, вільну від бактеріального та грибового забруднення з біологічною активністю не нижче 10^{8,5} ТЦД₅₀/см³ вірусу хвороби Ньюкасла, до якої додавали пеніцилін у дозі 100–200 ОД / см³ стрептоміцин – 100–200 мкг / см³. Вірусну масу, змішували зі стерильним стабілізуючим захисним середовищем у рівних об'ємних співвідношеннях. Суміш ретельно перемішували. Вірусмішувачу суспензію розливали з дотриманням правил асептики, у залежності від потреби, у криобіорки та негайно закривали. Вірусний матеріал заморожували стовпчиком у низькотемпературних холодильних установках за температури не вище мінус 70 °C і витримували при цьому температурному режимі. У випадку мобілізації, камеру сублімаційної установки дезінфікували (фламбували), охолоджували конденсор установки за температури мінус 45–50 °C, швидко завантажували заморожену у флаконах вірусну суспензію зі стабілізатором у сушильні вакуум-камери (протягом 2–3 хв), не допускаючи відтаювання біопрепарату у фасовках, герметично закривали кришку (двері) камери. Включали вакуум-насос і протягом 15–20 хвилин створювали вакуум до 100 мікрон, який витримували протягом усього періоду сушки. Через 1–3 години після завантаження вірусу, у вакуумсушильному апараті включали повітряний підігрів полиць з підвищенням температури біопрепарату на 1–2 °C за годину. Загальна тривалість сушіння вірусу близько 36–48 годин, у тому числі перший період сушіння (сублімація) становить близько 18–30 годин. Плюсова температура вірусмішувачого матеріалу не повинна перевищувати 25 °C. Контроль над процесом сушіння вели за температурними даними біопрепарату та тиску в сушильній камері. Після закінчення висушування в камеру выпускають стерильне повітря, поки тиск у ній не вирівняється із зовнішнім. Відкривши камеру, флакони швидко перекладали у вакуум-камери, в яких вірус міститься під вакуумом у 200–250 мікрон до моменту герметизації під вакуумом гумовими пробками та закрючують алюмінієвими ковпачками. Датою виготовлення сухого зразка вірусу вважається день закінчення ліофілізації. Висушені зразки вірусів у флаконах, після паспортизації біологічних параметрів, стікують і зберігають в опечатаних металевих контейнерах за температури мінус 40 °C.

Результати досліджень. У 2012 році була проведена робота із застосування клітинних культур для індикації вірусу хвороби Ньюкасла зразок польового ізоляту РМV-1/гуска білолоба /Асканія-Нова /48-15-02/11 (РМV-1/white-fronted Goose/Askaniya-new/48-15-02/11), щоб встановити ЦПД у культурі ФЕК. Один із застосовуваних методів є виділення вірусу шляхом зараження чутливих клітинних культур фібробластів курчат. Готували первинну культуру фібробластів курей використовуючи ембріони 10–11-добової інкубації з господарств вільних від інфекційних хвороб. Курячі ембріони інкубувалися в лабораторному інкубаторі відділу з вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ». Транспортували ембріони у термоконтейнері, що дозволяло якомога довше зберігати темпе-

ратуру інкубації. Ембріони переглядали за допомогою овоскопу та позначали олівцем місце знаходження повітряної камери (пуги). Поверхню шарлупи обробляли 70% розчином спирту та фламбували. Після розтину шарлупи в ділянці пуги ембріони виймали асептичним способом і розміщували у стерильній чашці Петрі. Ембріони тричі промивали від залишків ембріональних оболонок та екстраембріональної рідини розчином Хенкса з антибіотиками. У курячих ембріонах видаляли крильця, ноги та голови. Тушки ембріонів переносили до стерильного флакону з широкою шийкою, де їх подрібнювали ножицями на фрагменти розміром 4–5 мм, після чого тричі промивали розчином Хенкса з антибіотиками. Подрібнену тканину переносили у скляну плоскодонну колбу та залишали в 0,125–0,25 % розчині трипсину у співвідношенні 1:10.

Попередньо простерилізований магніт, вносили, опускаючи обережно по стінці, у колбу, яку ставили на магнітну мішалку. Швидкість перемішування була такою, щоб на поверхні рідини не утворювалось шумовиння. Трипсинізацію проводили у 2–3 цикли по 20 хвилин. Диспергуючу суміш з клітинами фільтрували через чотирьохшаровий стерильний марлевий фільтр і додавали 0,5–1 мл сироватки крові ВРХ для інактивації трипсину.

Профільтровану клітинну суспензію концентрували центрифугуванням при 1500 об/хв., протягом 15 хвилин. Після центрифугування супернатант відкидали, а до осаду додавали 50 мл ростового живильного середовища та обережно ресуспендували плавними круговими рухами. Потім проводили підрахунок живих клітин, додавали до ростового живильного середовища, що складається з різних об'ємів середовища Ігла та 199 з 10 % сироватки крові ВРХ. Клітини вирощували за температури 37 °С впродовж 24–48 годин. За цей час формується моношар, придатний до зараження вірусним матеріалом.

Дослідження вірусологічних агентів польових ізолятів вірусу хвороб Ньюкасла здійснювали шляхом трьох сліпих пасажів на культурі ФЕК для встановлення ЦПД. Робота проводилась у лабораторії з вивчення вірусних хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» у ламінарному боксі з дотриманням правил біологічної безпеки.

Інфекційно активним ізолятом 1:256 заразили культуру ФЕК, що вирощена на культуральних флаконах об'ємом 200 мл. шляхом інокулювання 1,5 мл досліджуваного матеріалу. Інфіковану культуру клітин інкубували 1 годину в термостаті за температури 37 °С, після чого вносили підтримуюче живильне середовище (суміші середовищ 199 і Ігла з сироваткою крові ВРХ). ЦПД почала проявлятися вже на першому пасажі. Цитопатогенна дія характеризувалась округленням клітин, формуванням ними вогнищевих утворень в моношарі, у подальшому – розриві між клітинами, які призвели до деструкції моношару клітин.

Висновки. 1. Проведена нами робота підтвердила технологічні прийоми, що використовуються при пасажуванні вірусу хвороб Ньюкасла на культурі ФЕК шляхом сліпих пасажів.

2. Установлено гемаглютинуючі активності (ГА) у культурі ФЕК польового ізоляту PMV-1/гуска білолоба /Асканія-Нова /48-15-02/11 (PMV-1/white-fronted Goose/Askaniya-new/48-15-02/11), який склав 1:256 титр.

3. Доведено, що зберігати польові ізоляти вірусу хвороби Ньюкасла необхідно в умовах низькотемпературних холодильних установках за температури не вище мінус 70 °С.

Список літератури

1. Абуғалиева, Г.К. Иммунологическая реактивность организма животных по отношению к вирусу гриппа птиц [Текст] / Г.К. Абуғалиева, Л.Б. Кутумбетов, Б.Ш. Мырзахметова // Актуальные проблемы микробиологии и вирусологии : материалы Междунар. науч.-практ. конф. ; МОН РК РГП «Центр биологических исследований». – Алматы, 2009. – С. 219–222.
2. Мырзахметова, Б.Ш. Цитопатогенность вирусов гриппа птиц и болезни Ньюкасла [Текст] / Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов // Высшее образование и аграрная наука – сельскому хозяйству : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Семей-Казахстан, 2009. – Т. 1. – С. 103–106.
3. Мырзахметова, Б.Ш. Динамика количественного изменения иммунокомпетентных факторов крови кроликов под воздействием иммуностимуляторов [Текст] / Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов // Теория и практика борьбы с болезнями животных в Республике Казахстан : сб. науч. тр. КАЗНИВИ. – Алматы, 2009. – Т. LV. – С. 190–195.
4. Мырзахметова, Б.Ш. Антигенность вирусов гриппа и болезни Ньюкасла [Текст] / Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов // Вестн. науки Каз. АТУ им. С. Сейфуллина. – 2010. – № 1. – С. 32–34.
5. Мырзахметова, Б.Ш. Оптимизация способов специфической профилактики особо опасных болезней птиц [Текст] / Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов // Вестн. с.-х. науки. – Алматы, 2010. – № 7. – С. 63–67.
6. Мырзахметова, Б.Ш. Иммуногенность инактивированной ассоциированной вакцины против гриппа птиц и болезни Ньюкасла при применении выпаиванием [Текст] / Б.Ш. Мырзахметова, Л.Б. Кутумбетов // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология. – Алматы, 2010. – № 4. – С. 160–165.
7. Заявка №2010/0047.1 на инновационный патент. Инактивированная ассоциированная вакцина против гриппа птиц и болезни Ньюкасла / Кутумбетов Л.Б., Кульбаева К.Р., Мырзахметова Б.Ш. ; Приоритет от 15.01.2010 г. Комитет по правам интеллектуальной собственности МЮ РК.
8. Прохорятова, О. Співкультування герпес- та параміксівірусів птахів на курячих ембріонах [Текст] / О. Прохорятова, В. Бабкін, Н. Біла // Вет. медицина України. – 1999. – № 3. – С. 16–17.
9. Прохорятова, Е.В. Индикация и идентификация болезней Ньюкасла и инфекционного ларинготрахеита с помощью метода флуоресцентных зондов [Текст] / Е.В. Прохорятова, И.В. Белая // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 1998. – Вип. 73. – С. 42–44.
10. Отримання ліофілізованної вірус-вакцини зі штаму «ВНД1ХП-У» проти інфекційного ларинготрахеїту птиці [Текст] / В.Ф. Бабкін [та ін.] // Пробл. зооінженерії та вет. медицини. – 1998. – Вип. 4, т. 2., – С. 89–90.
11. Говтвян, Н.В. Ефективність дослідного зразка вакцини проти хвороб Гамборо і Ньюкасла [Текст] / Н.В. Говтвян // Вет. медицина України. – 1997. – № 1. – С. 19.

VIROLOGICAL INDICATION OF NEWCASTLE DISEASE IN PRIMARY CULTURE FIBROBLASTS (FEC), THE STUDY OF INFECTIOUS PROPERTIES OF FIELD ISOLATES AND STORAGE

Stegniy M. Yu., Voroshilov I. S.

National Scientific Centre «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

The paper is devoted to method of the diagnosis Newcastle disease on primary fibroblast cultures (FEC). The accumulation of infectious Newcastle disease virus on the chicken – embryos has been investigation first. It is work was carried out in the cultivation and detection of Newcastle disease agents in primary culture cells. The findings about features of Newcastle disease virus cultivation on chicken embryos has been used primary fibroblast cultures (FEC).