УДК 619:578.823.2:636.5:57.082.26

ІНАКТИВАЦІЯ ШТАМІВ 1733 ТА BR-06 РЕОВРУСУ, ІЗОЛЬОВАНИХ ВІД ХВОРИХ НА ТЕНДОСИНОВІТ КУРЕЙ

Ніколаєнко Ю.Ю. [1]
Інститут птахівництва УААН

Розроблено режим інактивації штамів 1733 та Br-06 реовірусу курей, які будуть використані при конструюванні інактивованих вакцин. Встановлено, що етиленімін (ЕІ) у концентрації 0,1 % повністю інактивує штами 1733 та Br-06 протягом 24 годин за температури 37,5 °С.

Проведення профілактичних заходів проти вірусних хвороб у птахівництві засновано, головним чином, на застосуванні специфічних засобів профілактики, серед яких особливе місце належить інактивованим вакцинам. Серед найактуальніших задач у конструюванні таких біопрепаратів є підвищення їх безпечності й ефективності.

Однією з головних задач при одержанні інактивованих вакцин є визначення способу інактивації вірусів, який забезпечував би необоротне пошкодження їх реплікативного механізму та збереженість вихідної антигенної структури. Під інактивацією вірусів розуміють усунення здібності до інфікування та репродукції в організмі сприйнятливих хазяїв і культурах клітин, шляхом дії на них фізичними та хімічними факторами [1, 2].

Для інактивації вірусів із хімічних сполук частіше використовують формальдегід, глютаровий альдегід і похідні етиленіміну. Формальдегід інактивує віруси завдяки високій реакційній можливості по відношенню до білків і нуклеїнових кислот. Глютаровий альдегід викликає агрегацію вібріонів завдяки утворюванню міжмолекулярних зв'язків у результаті взаємодії діальдегіду з аміногрупами поверхневих білків віріонів. А етиленімін інактивує вірус з мінімальним пошкодженням його структури. У зв'язку з цим останнім часом для інактивації вірусів застосовують азиридини, особливо етиленімін та його похідні, такі, як димер етиленіміну. При дії формальдегіду, вірус втрачає значну частину антигенної активності, тоді як димер етиленімін впливає тільки на нуклеїнову кислоту [2–4].

Одержані при цьому неінфіковані агенти виявлялися зручними у подальшій роботі – концентруванні та очистці вірусу [5].

Метою даної роботи є розробка режиму інактивації реовірусу курей при використанні інактиванту етиленіміну, який буде використано при конструюванні інактивованих вакцин проти реовірусної інфекції.

Матеріали і методи. У роботі використовували одношарову культуру клітин фібробластів курячих ембріонів (ФЕК); штами реовірусу: 1733 (ВГНКІ, м. Москва) та Br-06, ізольованого від хворих на тендосиновіт курчат-бройлерів в одному з птахівничих господарств Харківської області. Вихідні титри штамів до інактивації складали: 1733 – 6,6 lg $ТЦД_{50}/см^3$, Br-06 7,55 lg $ТЦД_{50}/см^3$.

Штам 1733 реовірусу використовується нами при конструюванні чотирьохвалентної інактивованої емульсинвакцини для щеплення ремонтного молодняку курей проти ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту, синдрому зниження несучості та реовірусної інфекції. Штам Br-06 реовірусу – при розробці інактивованої моновалентної вакцини проти реовірусної інфекції курей. Штами депоновані в ДНКІБШМ (м. Київ).

У якості інактиванту використовували етиленімін (ЕІ) виробництва інституту фізичної хімії (м. Москва). Робочий розчин інактиванту готували шляхом розведення комерційного препарату фізіологічним розчином до 10 % концентрації; pH розчину доводили до 7,4 розчином оцтової кислоти.

Для вивчення інактивуючої активності ЕІ у вірусвміщуючий матеріал вносили різну кількість інактиванта у кінцевих концентраціях 0,05 %; 0,1 % і 0,15 %.

[1] Науковий керівник – д-р вет. наук Наливайко Л.І.

При цьому враховували температурний фактор – інактивацію реовірусу проводили за температури 25±0,5 та 37±0,5 °С протягом 12, 24, 30 та 42 годин.

Залишкову інфекційність інактивованого реовірусу визначали методом послідовних чотирьох «сліпих» пасажів у культурі клітин ФЕК.

Результати досліджень. Результати проведених досліджень щодо визначення інактивуючої здатності ЕІ щодо реовірусу птиці показали, що інактивант у кінцевій концентрації 0,05 % повністю не інактивує вірус. Повноту інактивації патогенних штамів 1733 та Br-06 реовірусів було одержано при дії ЕІ в кінцевих концентраціях 0,1 % та 0,15 % протягом 24 годин за температури 37,5 °С. За умови кінцевої концентрації ЕІ 0,1 % в культурі клітин ФЕК не спостерігали цитопатичної дії реовірусу після четвертого «сліпого» пасажу. У результаті дії інактиванту в концентрації 0,15% спостерігали руйнування ФЕК вже на другу добу четвертого пасажу. Тому в подальших дослідженнях при конструюванні лабораторних зразків інактивованої моновакцини проти реовірусної інфекції використовували 0,1 % концентрацію ЕІ (табл. 1, 2).

Таблиця 1 – Вплив дії ЕІ на інфекційну активність штаму 1733 реовірусу

№ п/п	Титр вірусу до інактивації, lg $ТЦД_{50}/см^3$	Термін інактивації, год.	Температура інактивації, °С					
			25±0,5			37±0,5		
			Кінцева концентрація ЕІ, %					
			0,05	0,1	0,15	0,05	0,1	0,15
1	6,6	12	4,0±0,12	3,25±0,12	1,25±0,21	3,5±0,22	1,25±0,12	0
2		24	2,25±0,14	1,0±0,10	0	0,55±0,16	0	0
3		30	0,25±0,11	0	0	0	0	0
4		42	0	0	0	0	0	0

Таблиця 2 – Вплив дії ЕІ на інфекційну активність штаму Br-06 реовірусу

№ п/п	Титр вірусу до інактивації, lg $ТЦД_{50}/см^3$	Термін інактивації, год.	Температура інактивації, °С					
			25±0,5			37±0,5		
			Кінцева концентрація ЕІ, %					
			0,05	0,1	0,15	0,05	0,1	0,15
1	7,55	12	4,25±0,23	3,5±0,22	1,35±0,14	4,0±0,11	1,50±0,21	0
2		24	2,5±0,18	1,25±0,20	0	0,55±0,10	0	0
3		30	0,25±0,11	0	0	0	0	0
4		42	0	0	0	0	0	0

Встановлена залежність інфекційної активності реовірусу від концентрації ЕІ у вірусній суспензії. Вірус обох штамів починав втрачати свою інфекційну активність у кінцевій концентрації ЕІ 0,15 % за температури 37,5 °С вже через 12 годин. Повну інактивацію вірусу спостерігали за температури 37,5 та 25 °С у кінцевих концентраціях 0,1 та 0,15 % через 30 та 24 годин відповідно.

При проведенні послідовних чотирьох «сліпих» пасажів у культурі клітин ФЕК залишкову інфекційність інактивованих штамів реовірусу не спостерігали.

Висновки. На основі проведених досліджень нами встановлено, що етиленімін володіє вираженою інактивуючою дією щодо штамів 1733 та Br-06 реовірусу.

Інактивацію реовірусу необхідно проводити за кінцевої концентрації 0,1%, експозиції 24 години за температури 37,5 °С.

Список літератури

1. Изучение условий инактивации реовируса птиц [Текст] / В.И. Шкиря, С.К. Старов, А.Б. Сарбасов., Н.П. Филиппова // Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику : материалы конф. мол. ученых. — Владимир, 2000. — С. 12–14. ***2.*** Brown, F. The use of acetylethylenimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines [Text] / F. Brown, N. St. G. Hyslop, J. Crick, A.W. Morrow // J. Hyg. Camb. — 1963. — Vol. 61, № 3. — P. 337–344. ***3.*** Вирусные болезни животных [Текст] / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. — М.: ВНИТИБТ, 1998. — С. 183–198. ***4.*** Сергеев, В.А. Инактивированные вакцины [Текст] / В.А. Сергеев // Вирусные вакцины. — К, 1993. — С. 150–181. ***5.*** Doel, T.R. Inactivation of viruses produced in animal / T.R. Doel // Animal Cell Biotechnology. — London, 1985. — Vol. 2. — P. 124–149.

INACTIVATION OF THE STRAINS 1733 AND BR-06 REOVIRUS, ISOLATED FROM SICK WITH TENOSYNOVITE HENS

Nikolaenko Yu.Yu.

Poultry Research Institute of UAAS

It has been worked out the regime of inactivation of strains 1733 and Br-06 of the chicken reovirus, which will be used for constructing of inactivated vaccines. It has been established that the ethylamine at the concentration 0.1 % inactivates strains 1733 and Br-06 for 24 hours when the temperature is 37.5 °C.

УДК 619:576.535

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ПАСПОРТИЗАЦИИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК

Ночевный В.Т., Ласкавый В.Н.

ГНУ Саратовская НИВС РАСХН, г. Саратов, Россия

В статье обоснована возможность применения метода проточной цитометрии (ПЦ) для контроля пяти перевиваемых сублиний клеток по размерам, гранулярности, фазам клеточного цикла и апоптозу.

Экспериментально доказана прямая зависимость величины апоптоза с ростовыми свойствами и чувствительностью к модельным вирусам.

Основой эффективного производства противовирусных иммунобиологических препаратов (ИБП) является доступность, высокая чувствительность и стабильность свойств клеточного субстрата. Применение первичных культур клеток, как правило, не перспективно из-за дефицита и контаминации тканевого сырья и не экономично из-за трудоемкости производства биопрепаратов. Наиболее успешно в практике используют перевиваемые линии клеток (ПЛК), аттестованные в соответствии с требованиями отечественных и международных стандартов [1,2,3]. Необходимо отметить, что указанные методы контроля ПЛК достаточно трудоёмки и длительны в исполнении. Поэтому поиск более перспективных методов контроля качества культуральных моделей (КМ), в особенности ПЛК гомологичного вида, сохраняемых в отечественных и международных коллекциях является своевременным и актуальным [4,5,6,7].

В последние десятилетия для этих целей широко используют достаточно эффективный, высокоскоростной экспресс-метод проточной цитометрии (ПЦ) и клеточной сортировки аналитические возможности которого весьма разнообразны и позволяют объективно оценить морфологические, физиологические и цитохимические показатели, изучить фазы клеточного цикла и структурные компоненты клеток, количественно определить поверхностные и внутриклеточные антигены и мембранные рецепторы, а также осуществить выделение и анализ клонов и кле-