

9. H. N. Jonson. Реакция нейтрализации на белых мышах / Jonson H. N. // Методы лабораторных исследований по бешенству – Женева: Медицина, 1975. – С. 319–327.
10. R. J. Lorenz. Статистические методы обработки результатов. Метод Sperman-Kärber / R. J. Lorenz, K. Bögel // Методы лабораторных исследований по бешенству – Женева: Медицина, 1975. – С. 319–327.

#### CALIBRATION OF BRANCH STANDARD SAMPLE OF ANTI-RABIES IMMUNOGLOBULIN FROM RABBITS BLOOD SERUM

*Polupan I. M., Mazur N. V., Nedosekov V. V.*

*Institute of Veterinary Medicine of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

*Objective. To perform calibration of branch standard sample of anti-rabies immunoglobulin from rabbits blood serum to The 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human.*

*Materials and methods of research. For study we used previously obtained a standard sample of anti-rabies immunoglobulin.*

*Calibration of obtained lyophilized preparation was performed relative to the International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human (30 IU/ml) in virusneutralization reactions – mouse neutralization test (MIT) and FAVN-test by triple study.*

*Potency of Branch standard sample of anti-rabies immunoglobulin was determined in MIT and FAVN-test.*

*Results of research. Quite often activity of anti-rabies globulin differs depending on the method used for evaluation. In this regard, WHO recommends to use virusneutralization methods to calibrate potency of national standard samples for anti-rabies immunoglobulin.*

*In results of calibration of branch sample for anti-rabies immunoglobulin we showed potency in MIT at 11.03 IU/ml, and FAVN-test - 11.27 IU/ml.*

*Conclusions. 1. In results of calibration of branch sample for anti-rabies immunoglobulin we showed potency in MIT at 11.03 IU/ml, and FAVN-test - 11.27 IU/ml.*

*2. Developed branch standard sample of anti-rabies immunoglobulin is stable at the expense of storage in lyophilized form and suitable for determining the potency of anti-rabies immunoglobulins by in vivo and in vitro methods.*

**Keywords:** anti-rabies immunoglobulin, anti-rabies potency, Branch standard sample

УДК: 619:616.98:578.823.2:57.083.224:636.5

#### ВИВЧЕННЯ АДАПТАЦІЙНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ У РІЗНИХ КУЛЬТУРАХ КЛІТИН

*Потрясаєва О. О., Стегній Б. Т., Музика Д. В., Усова Л. П., Рула О. М.*

*Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна, e-mail: admin@vet.kharkov.ua*

*У статті наведені дані щодо перевірки адаптаційних властивостей штаму вірусу ІБХ у культурах клітин різного походження. У дослідженнях було вивчено здатність штаму вірусу ІБХ до культивування та накопичення у первинно-трипсинізованих культурах фібробластів курячих, перепелиних, гусячих, качиних ембріонів, а також перещеплюваних культурах клітин Vero.*

*Встановлено що більш ефективними системами культивування для вірусу ІБХ штаму «Winterfield 2512» виявилися первинні культури клітин ФЕК та ФЕП. Найвищі титри інфекційної активності штаму «Winterfield 2512» до первинних культур ФЕК та ФЕП – 5,85 та 5,80 Іг ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> відповідно було отримано на 10 пасажі.*

*Доведено відсутність впливу різних систем культивування на специфічність антигену вірусу ІБХ та придатність його для використання в якості компоненту тест-системи ІФА.*

**Ключові слова:** вірус ІБХ, культивування, культура клітин, інфекційна активність

Птахівничій галузі відчутних збитків завдає інфекційна бурсальна хвороба (ІБХ), економічні втрати від якої, складаються із загибелі курчат (від 5 до 40 %), зниження м'ясної продуктивності і збільшення відсотку вибракування птиці, особливо серед бройлерів та, у випадках субклінічного перебігу, збитками внаслідок імунодепресивної дії вірусу [3, 4, 6]. Сучасні методи діагностики та вакцинопрофілактика – це ключові рішення у боротьбі з даною інфекцією, а однією із головних умов їх ефективності є відповідність антигенних властивостей польових ізолятів збудника та штамів, які використовуються для виготовлення вакцин і діагностичних препаратів [5].

Використання культур клітин займає провідне місце як у експериментальній, так і у практичній ветеринарній вірусології. Важливе місце посідають первинні культури клітин завдяки їх високій специфічності та чутливості, а також з огляду на простоту їх одержання та низьку собівартість. Для культивування вакцинних штамів проти хвороби Гамборо використовують ВПФ-курячі ембріони, так як комерційні курячі ембріони містять залишкові материнські антитіла проти вказаного вірусу, що може впливати на рівень титру вакцинного штаму під час його культивування. До того ж, випадки контамінації культур клітин із комерційних курячих ембріонів іншими вірусами та мікоплазмами, також спонукають до пошуку інших систем для культивування вірусу [2].

За даними наукової літератури, були спроби адаптації вірусів хвороби Гамборо до різних біологічних систем [1]. Відсутність інформації щодо досліджень в Україні адаптаційних можливостей вірусу ІБХ штаму «Winterfield 2512» у різних культурах клітин свідчить про недостатність вивчення даного питання, що і визначає напрямки подальших наукових досліджень, а адаптовані антигени вірусу ІБХ можна використовувати при створенні вітчизняних діагностичних тест-систем, які б відповідали світовим стандартам якості.

**Метою** даної роботи було вивчити здатність вірусу ІБХ штаму «Winterfield 2512» до культивування в різних культурах клітин.

**Матеріали та методи.** Вірус. Сухий штам «Winterfield 2512» вірусу інфекційної бурсальної хвороби з колекції ННЦ «ІЕКВМ», адаптований на 9-10-ти добових ВПФ-курячих ембріонах одним пасажем.

**Пташині ембріони.** 9–10-добові ВПФ-ембріони курей, 8–9-добові перепелині ембріони, 11-добові качині ембріони, 13-добові гусячі ембріони, отримані з благополучних з інфекційних хвороб господарств.

**Культури клітин.** Первинно-трипсинізовані культури курячих, перепелиних, качиних і гусячих фібробластів, перещеплювана культура клітин Vero з колекції ННЦ «ІЕКВМ».

**Поживні середовища, розчини, реактиви.** Середовище Ігла модифіковане живильне (ДМЕМ), середовище 199 культуральне живильне виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», сироватка крові великої рогатої худоби нативна без консервантів виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина»; полістиролові планшети для ІФА виробництва NUNK типу Maxisorb (Данія), полістиролові культуральні планшети SARSTEDT.

**Культивування штаму вірусу ІБХ** здійснювали у первинно-трипсинізованих культурах фібробластів пташиного походження, які отримували із шкірно-м'язової тканини ембріонів методом, запропонованим Dulbeco і Voget у модифікації Ягнера (1954). Культури фібробластів ембріонів птиці вирощували у флаконах і матрасах у живильних середовищах Ігла та 199 вітчизняного виробництва з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Для підтримки життєздатності інфікованих досліджуваним вірусом культур клітин використовували суміш цих середовищ у рівних пропорціях з додаванням 2 % сироватки крові великої рогатої худоби.

Для культивування вірусу ІБХ у перещеплювальній культурі клітин Vero використовували 0,02 % розчин Версена та 0,25 % розчин трипсину.

Характер цитопатичних змін вивчали за допомогою інвертованого мікроскопу «Біолам П-1» («Ломо»).

**Імуноферментний аналіз.** Оптимальні умови постановки реакції визначали експериментально. Визначення робочого розведення антигену ІБХ і відпрацювання методики постановки реакції ІФА здійснювали згідно з методичними вказівками, розробленими у ФДБУ «ВНДІЗТ» [7].

**Статистична обробка.** Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами [8].

**Результати досліджень.** Найбільш оптимальними посівними концентраціями для одержання повного моношару культур пташиних фібробластів через 24 години була концентрація клітин  $8 \times 10^5$ . Для перещеплюваної лінії Vero використовували концентрацію клітин у кількості 150–200 тис. кл/см<sup>3</sup>. Більш низькі концентрації клітин не забезпечували формування повного моношару за 24 години. Зразки культур пташиних фібробластів і перещеплювальної культури використовували як на скляних, так і на пластикових носіях. Зараження культур клітин виконували шляхом внесення досліджуваного штаму вірусу ІБХ у розведенні 1:10 з наступним контактом культури та вірусу протягом 1 год., суміші культивували у підтримуючому середовищі за температури 37 °С. Динаміка цитопатичних змін відображена у таблиці 1.

**Таблиця 1** – Динаміка ЦПД штаму «Winterfield 2512» вірусу ІБХ у культурах клітин різного походження

№ з/п	Культури клітин	Терміни та характер прояву ЦПД, % деструкції моношару				
		24 год.	48 год.	72 год.	96 год.	120 год.
1	ФЕК	б/з	Округлення клітин	40 %	70 %	до 100 %
2	ФЕП	б/з	Округлення клітин	30 %	70 %	до 100 %
3	ФКачЕ	б/з	б/з	Округлення клітин	30 %	50 %
4	ФГЕ	б/з	б/з	б/з	б/з	б/з
5	Vero	б/з	б/з	Округлення клітин	30 %	70 %

Примітка: б/з – без змін

Як показують результати, представлені в таблиці 1, перші характерні цитопатичні зміни моношару проявлялися через 48 годин у первинних культурах ФЕК з ВПФ-ембріону та ФЕП. Вони мали однакові характерні ознаки: округленням клітин, зливання їх меж і утворення симпластів. У первинній культурі ФКачЕ та перещеплювальній культурі клітин Vero перші аналогічні цитопатичні зміни проявилися через 72 год., через 96 годин деструкція клітин моношару була виражена на 30 %, а до 120 години культивування – руйнування моношару було виражене на 50 % та 70 % відповідно.

Найбільш характерні результати ЦПД ми спостерігали в культурах клітин ФЕК та ФЕП. Динаміка прояву цитопатичних змін під дією вірусу в обох культурах була схожою. Так, через 72 години руйнування моношару було виражено на 30 % та 40 % відповідно, через 96 годин – однаково на 70 % в обох культурах. При цьому проявлялася чітко виражена вакуолізація клітин, майже повне руйнування міжклітинних зв'язків, більшість клітин відшаровувалися від скла у підтримуюче середовище. Через 120 годин культивування спостерігали максимальне руйнування клітин фібробластів. Усі зразки, які мали характерні ознаки ЦПД, були перевірені на відсутність контамінації бактеріальною мікрофлорою згідно з ДСТУ 4483 на тіогліколевому середовищі. ЦПД у первинній культурі ФГЕ була відсутня впродовж усього терміну культивування, що свідчило про нечутливість даної культури клітин до вірусу ІБХ.

З метою адаптації штаму «Winterfield 2512» вірусу ІБХ до культур клітин було проведено по 10 послідовних пасажів у культурах ФЕК і ФЕП та по 6 послідовних пасажів у культурах клітин ФКачЕ, перещеплювальної лінії Vero з подальшим визначенням титру інфекційної активності досліджуваного штаму (таблиця 2).

**Таблиця 2 – Рівень накопичення штаму «Winterfield 2512» вірусу ІБХ у культурах клітин різного походження**

№ з/п	Культури клітин	Титр інфекційної активності штаму вірусу ІБХ, Іg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>						
		4 пасаж	5 пасаж	6 пасаж	7 пасаж	8 пасаж	9 пасаж	10 пасаж
1	ФЕК	-	-	3,0± 0,14	3,0± 0,25	3,75± 0,18	4,85± 0,15	5,85± 0,18
2	ФЕП	-	-	2,75± 0,17	3,0± 0,18	3,65± 0,25	4,75± 0,25	5,80± 0,25
3	ФКачЕ	-	2,13 ±0,17	2,15 ±0,13	н/д	н/д	н/д	н/д
4	Vero	2,67 ±0,18	2,75± 0,14	2,75 ±0,17	н/д	н/д	н/д	н/д

Примітка: н/д – не досліджували

Як показують результати, представлені в таблиці 2, максимальний титр інфекційної активності досліджуваного штаму вірусу ІБХ у культурі ФЕК з ВПФ-ембріону становив 5,85 Іg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> на 10 пасажі. Культивування вірусу в культурі клітин ФЕП призвело до поступового зростання титру інфекційної активності після 5 пасажу. Максимальний титр складав 5,80 Іg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> після 10 пасажу. При культивуванні вірусу ІБХ у КК ФКачЕ та КК Vero ми визначили повільне його накопичення і титр інфекційної активності 2,13 – 2,75 Іg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Наступним етапом нашої роботи була перевірка придатності адаптованого в КК ФЕК та ФЕП штаму «Winterfield 2512», для використання його в якості антигену для ІФА.

З метою збільшення кількості вірусного білка проводили концентрування антигену шляхом додавання ПЕГ-6000 до кінцевої концентрації 7 % з подальшою інкубацією за температури 4 °С протягом

18 год та центрифугуванням при 4000 об/хв упродовж 90 хв. Осад розчиняли у мінімальному об'ємі фосфатного буфера (рН 7,4). Таким чином було отримано по 2 см<sup>3</sup> концентрованих антигенних препаратів вірусу ІБХ.

Специфічність та робоче розведення антигенів перевіряли методом ІФА з референтними позитивним і негативним зразками сироваток та гетерологічними сироватками з антитілами до ньюкаслської хвороби, грипу птиці, інфекційного бронхіту курей, інфекційного ларинготрахеїту, метапневмовірусної інфекції, аденовірусної інфекції 4 серотипу, інфекційного енцефаломієліту.

Для цього планшети було сенсibiliзовано антигеном вірусу інфекційного бурситу штаму «Winterfield 2512» у розведенні від 1:50 до 1:12000 та блоковано 1 % розчином БСА. Сироватки вносили по 100 мкл у розведенні 1:400. Інкубували планшети впродовж 30 хв за температури 37 °С. Надлишок компонентів видаляли шляхом триразового промивання. В якості субстрату використовували ТМБ. Облік результатів проводили на рідері при довжині хвилі 450 нм (таблиця 3).

За результатами, представленими у таблиці 3, оптична густина позитивної сироватки до вірусу ІБХ була більш ніж у 2 рази вище оптичної густини негативної контрольної сироватки (7,18±0,03), що свідчило про високу якість отриманого антигену та його придатність для використання в якості компоненту тест-систем ІФА. Показники оптичної густини гетерологічних сироваток були на рівні негативного контролю, тобто отриманий нами антиген є специфічним.

Таблиця 3 – Характеристики антигену вірусу ІБХ

Показники	Результати визначення
Робоче розведення антигену	1:10000
ОГ фонового забарвлення (M±m)	0,054±0,002
ОГ позитивних контролів (M±m)	0,510±0,019
ОГ негативних контролів (M±m)	0,071±0,002
Співвідношення K+/K <sup>-1</sup>	7,18±0,03
Визначення специфічності	
Оптична густина K+(AI)	0,187±0,002
Оптична густина K+(HX)	0,175±0,004
Оптична густина K+(ІЛТ)	0,213±0,005
Оптична густина K+(ІБК)	0,186±0,007
Оптична густина K+(АВП-4)	0,220±0,020
Оптична густина K+(МПВ)	0,196±0,051
Оптична густина K+(ІЕП)	0,203±0,002
Оптична густина K+(РЕО)	0,195±0,005

Примітка: <sup>1</sup> – співвідношення значень оптичної густини позитивної та негативної контрольних сироваток

**Висновки.** 1. Доведено, що більш ефективними системами культивування для вірусу ІБХ штаму «Winterfield 2512» виявилися первинні культури клітин ФЕК та ФЕП.

2. Найвищі титри інфекційної активності штаму «Winterfield 2512» до первинних культур ФЕК та ФЕП – 5,85 та 5,80 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> відповідно було отримано на 10 пасажі.

3. Доведено відсутність впливу різних систем культивування на специфічність антигену вірусу ІБХ та придатність його для використання в якості компоненту тест-системи ІФА.

#### Список літератури

1. Алиев А.С. Адаптация вируса болезни Гамборо к перевиваемой культуре клеток [Текст] / А. С. Алиев [и др.] // Ветеринарные проблемы птицеводства : тез. докл. науч.- произв. конф. - Л., 1990. - С. 8-9.
2. Гарагуля Г.І. Застосування культур клітин з перепелиних ембріонів як біологічних систем для культивування вірусів [Текст] / Г.І. Гарагуля, І. Я. Морозова // Вісник Сумського нац. аграр. ун-ту: Науково-метод. журнал. Сер. «Вет. медицина». Вип. 8.- Суми, 2002.- С. 17-20.
3. Джавадов Э.Д. Иммунодефициты вирусной этиологии в промышленном птицеводстве: состояние и перспективы [Текст] / Э. Д. Джавадов // Зооиндустрия. - 2001. - № 5. - С. 15-17.
4. Кэллек Б.У. Болезни домашней и сельскохозяйственной птицы [Текст] / Б. У. Кэллек. – М.: Аквариум, 2003. – 1232 с.
5. Оковытая Т. В. Разработка диагностических тест-систем для инфекционной бурсальной блоезни на основе иммуноферментного анализа [Текст]: дис. ... канд. биол. наук : 03. 00.06 / Т. В. Оковытая. - Владимир, 2000. - 16 с.
6. Стегній Б.Т. Забезпечення епізоотичного благополуччя птахогосподарств України щодо інфекційної бурсальної хвороби [Текст] / Б.Т. Стегній [та ін.] // Збірн. наук. праць ХДЗВА «Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини». -Харків, 2015.- В. 30.- ч. 2, - С. 157 – 164.
7. Дрыгин, В. В. Иммуноферментный анализ в диагностике инфекционных заболеваний животных [Текст] : метод. указ. по диагностике заболеваний с/х животных иммуноферментным методом / В. В. Дрыгин, А. А. Гусев, А. Н. Панин. — Владимир, 1998. — С. 6–9.
8. Лакин, Г. Ф. Биометрия [Текст] / Г. Ф. Лакин. — М. : Высш. школа, 1990. — 352 с.

#### STUDYING OF ADAPTATION CHARACTERISTICS FOR INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN VARIOUS CELL CULTURES

Potrijasajeva O. O., Stegnyy B. T., Muzyka D. V., Usova L. P., Rula O. M.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The passage represents data of adaptation characteristics assay for IBD virus strain in cell cultures of different origins. We studied the cultivation and accumulation capability of IBV virus strain in primarily trypsinized chicken, quail, goose and duck embryos' fibroblast cell cultures, as well as in Vero immortalized cell lines. It has been found that CEF and QEP primary cell cultures are the most effective for «Winterfield 2512» IBD virus strain's cultivation.

The highest titers of the strain's infectious activity against CEF and QEF cell cultures was obtained on the 10<sup>th</sup> passage and reached 5,85 and 5,80 lg TCE<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup> respectively. It has been proved, that there is no impact of different cultivation systems on the specificity of IBD virus antigen and its availability for using as the component for ELISA test kit.

**Keywords:** IBD virus antigen, infectious bursal disease, various cell cultures