
Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

УДК 578:57.083

АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННОГО ВИРУСА ЛИХОРАДКИ ДОЛИНЫ РИФТ

Балышева В.И., Капустина О.В., Закутский Н.И., Имамдинов И.Р.

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии, г. Покров, Российская Федерация

В настоящее время лихорадка долины Рифт (ЛДР) – объект пристального внимания исследователей, т.к. является особо опасным зооантропонозом и наносит огромный экономический ущерб, который складывается из потерь от абортос, высокого процента гибели молодняка, резкого снижения продуктивности скота, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, а также на госпитализацию и лечение людей [3]. ЛДР относится к особо опасным зооантропонозам: поражает овец, коз, крупный рогатый скот, лошадей, антилоп, обезьян, а также человека, имеет трансмиссивный механизм передачи членистоногими. Впервые новая болезнь, обозначенная как лихорадка долины Рифт (ЛДР), была обнаружена в Кении (долина Рифт), где в 1930 г. возникла эпизоотия, которая привела к большой гибели ягнят на фермах, принадлежащих европейцам.

Болезнь, однажды возникнув, долгие годы оставалась стационарной в ряде государств Африканского континента, Ближнего Востока (Израиль, Турция, Ирак, Саудовская Аравия, Йемен), регистрировалась в Европе (Португалия). Анализируя данные литературы, следует отметить, что ареал ЛДР имеет тенденцию широкого распространения: только за последние 10 лет болезнь регистрировали в 14 странах мира [4, 5, 6, 8]. С учетом торгово-экономических, культурных и туристических связей с зарубежными государствами и вступлением России в ВТО существует постоянная угроза заноса и распространения данной болезни в нашей стране. Глобальное потепление может привести к увеличению числа и распространению потенциальных переносчиков возбудителя болезни – комаров *Cx. tritaeniorhynchus* и *Ae. vexans arabiensis*, а в связи с этим распространением лихорадки долины Рифт и в Европе [8].

Наиболее эффективным средством борьбы является вакцинация животных, в том числе, и населения во время эпизоотии. Вакцинации подлежат также сотрудники специализированных лабораторий и ветеринары, работающие в Западной, Экваториальной и Южной Африке. Однако живые вакцины применяются только в основном для вакцинации животных, так как могут привести к осложнениям. Поэтому в настоящее время ведутся разработки инактивированных вакцин, среди которых особое место занимают вакцины 3-его поколения или ДНК-вакцины [4, 6, 7].

Вопросы культивирования возбудителя, его инактивации имеют важное значение для разработки инактивированных вакцин, являющихся наиболее безопасными профилактическими препаратами.

Для инактивации вирусов используют широкий спектр как физических, так и химических способов. Из химических соединений наиболее часто используют два главных типа инактиваторов: ретикулирующие (разрыхляющие) агенты и алкилирующие агенты. К ретикулирующим агентам относятся альдегиды, в том числе формальдегид, глутаральдегид и глицидальдегид, из которых наиболее часто используют формальдегид. К алкилирующим агентам относятся В-пропиолактон, этиленмин и другие азиридины.

Следует отметить, что инактивация должна быть не только эффективной, но и максимально щадящей. Иными словами, сопутствующие изменения в структуре вирусных частиц и их компонентов должны быть минимальными. Однако механизм действия инактиваторов во многих отношениях недостаточно выяснен, и их использование зачастую носит эмпирический характер. Важным условием изготовления иммуногенных инактивированных вакцин является подбор инактиватора с учетом структуры и свойств вируса, оптимальных условий инактивации, позволяющих необратимо подавить его инфекционную активность при максимальном сохранении антигенности [1, 2, 7].

Учитывая опыт отечественных и зарубежных исследователей в области разработок инактивированных вакцин против вирусных и бактериальных инфекций, целью наших исследований являлось изучение действия формалина, теотропина (А-24), димера этиленimina (ДЭИ), бета-пропиолактона на инфекционную и антигенную активность вируса лихорадки долины Рифт (ЛДР).

Материалы и методы. Вирус ЛДР штамм «1974-ВНИИВВиМ» с инфекционной активностью $6,0-6,5 \text{ г ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ получали из коллекции микроорганизмов ВНИИВВиМ.

Перевиваемые линии клеток почек: сибирского горного козерога (ПСГК-60 и ПСГК-60С, монослойный и суспензионный варианты соответственно); сирийского хомячка (ВНК-21/13); сайги (ПС).

Среда Игла (МЕМ) фирм Sigma (США), среда 0,25 % ФГМ-суспензионная, обогащенная витаминами группы «В» и глутамином ($600 \text{ мг}/\text{дм}^3$) с добавлением 5-10 % сыворотки крови КРС.

Реактивы: 1,8,3,6-дизиндометил-1,3,6,8-тетраацетилпептодекан (теотропин, А-24), димер этиленimina (ДЭИ), бета-пропиолактон, формалин (36,5 % формальдегида), гидроокись алюминия (ГОА, 6 % сухого остатка).

В опытах использовали клинически здоровых беспородных белых мышей (самки) 1-3 дневного возраста, массой 18-20 г, овец в возрасте 6-12 месяцев, массой 35-50 кг.

Вирус выращивали при 34°C в статических, роллерных и суспензионных условиях в течение 3-4 суток в зависимости от клеточного субстрата, множественности заражения и условий культивирования. Инфекционную активность вируса определяли по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ или $\text{lg MLD}_{50}/\text{см}^3$.

Инактивация вируса ЛДР. Работу по подбору инактиванта и оптимальных режимов инактивации проводили с осветленной вирусосодержащей культуральной жидкостью с инфекционной активностью не ниже $8,0 \text{ lg MLD}_{50}/\text{см}^3$, концентрация белка не превышала $0,5 \text{ мг}/\text{см}^3$.

Действие химических препаратов – теотропина, формалина, димера этиленimina на вирус изучали в следующих концентрациях: 0,2 %; 0,1 %; 0,05 %; 0,025 %; 0,001 % при различных температурах $18-22^\circ\text{C}$, 4°C , 37°C в течение 24-96 часов при периодическом перемешивании. Константу скорости инактивации вируса (К) рассчитывали по формуле, выражая в час^{-1} (потеря инфекционной активности вируса за час). Для изучения кинетики инактивации проводили отбор проб через 1, 3, 6, 18, 24, 48, 72 и 96 часов. На основании определения константы скорости инактивации вируса ЛДР рассчитывали время полной потери инфекционности, которое впоследствии проверяли экспериментально.

Полноту инактивации вируса определяли путем проведения трех последовательных пассажей инактивированного вируса в элективной культуре клеток, а также путем внутримозгового введения инактивированного материала мышам 1-3 дневного возраста.

Инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса после экспозиции вируса с инактивантами определяли методом параллельного титрования на мышатах, в РПГА и РСК.

Для оценки антигенной и иммуногенной активности инактивированного вируса использовали белых мышей массой 18-20 г, овец массой 35-50 кг. Животным вводили инактивированные препараты внутримышечно дважды с интервалом 14 суток в объеме 0,5 и 2,0 см^3 , соответственно. У животных для определения титра специфических антител отбирали пробы крови через 14, 21 и 28 суток после прививки, через 28 суток проводили заражение контрольных и вакцинированных животных вирулентным вирусом ЛДР штамм «Энтеббе» внутримышечно в дозе $1000 \text{ ЛД}_{50}/\text{см}^3$. За состоянием опытных животных вели наблюдение в течение 14 суток.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных экспериментов установлено, что через 3 часа инкубации при 37°C при конечной концентрации инактиванта 0,06-0,02 % резко снижается инфекционность вируса – на $4,7 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Через 24 часа после экспозиции вирус не обнаруживали в большинстве отобранных проб. Учитывая данные литературы, что инактивация при более низких температурах, чем 37°C способствует лучшему сохранению антигенных свойств вируса, динамику инактивации изучали при $18-22^\circ\text{C}$ и 4°C . Было установлено, что при воздействии формалина и бета-пропиолактона отмечается быстрое снижение инфекционной активности, затем замедление процесса инактивации замедляется.

При воздействии ДЭИ и А-24 было отмечено более постепенное, приблизительно одинаковое снижение инфекционности до полной ее потери через 48 часов. Однако, известно, что полная инактивация оставшегося вируса, инфекционная активность которого ниже $1 \text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, не всегда может быть обнаружена при титровании в результате случайного отбора проб, особенно при работе с большими объемами вирусного материала. Учитывая, что результаты инактивации вируса ЛДР в дальнейшем могут быть использованы для приготовления инактивированной вакцины, время экспозиции вирусного материала с инактивантами увеличили до 3 суток.

Окончательный выбор инактиванта был сделан после проведения опытов по изучению действия перечисленных инактивантов на антигенную активность вируса. Следует отметить, что воздействие на вирус ЛДР формалином или бета-пропиолактоном в конечной концентрации 0,2 % вело к снижению его гемагглютинирующей и комплементсвязывающей активности. Препараты, инактивированные ДЭИ и А-24, при следующем режиме инактивации: температура $18-22^\circ\text{C}$, время экспозиции 72-96 часов, конечная концентрация ДЭИ – 0,06 %, А-24 – 0,1 % сохраняли гемагглютинирующую и комплементсвязывающую активности. Полученные данные согласуются с данными, полученными другими исследователями при изготовлении инактивированных вакцин против инфекционных болезней животных [2].

Для оценки антигенных и иммуногенных свойств инактивированные ДЭИ и А-24 препараты вводили мышам и овцам, и на 21-28 сутки после инокуляции отбирали пробы крови для определения комплементсвязывающих и гемагглютинирующих антител в сыворотках крови животных. Титр комплементсвязывающих антител составлял 1:256-512, гемагглютинирующих – 1:512-1024, титр вирусспецифических антител в ТФ ИФА – 1:125-625.

Эффективность экспериментального образца инактивированной А-24 ГОА-сапониновой вакцины проверяли на овцах по уровню накопления ВН-антител. Установлено, что двукратная прививка образцами инактивированной вакцины индуцировала у привитых овец высокий уровень вируснейтрализующих антител, равный 1:10-1:64.

Привитые животные были устойчивы к контрольному заражению вирулентным штаммом вируса в дозе 1000ЛД.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований были подобраны инактиванты и оптимальные режимы инактивации, позволяющие получать инактивированное вирусное сырье с сохранением антигенной и иммуногенной активности. Данные результаты исследований могут быть учтены при изготовлении инактивированной вакцины против ЛДР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 11-08-01245-а

Список литературы

1. Балышева, В.И., Закутский, О.Г. Лаптева и др. Эффективность инактивированной вакцины против вируса блютанга 8-го серотипа // Ветеринария. 2008. – № 11. – С.20-22.
2. Гордон, А. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ / Ада Гордон, Алистер Рамсей. – М.: Медицина, 2002. – С. 24-25.
3. Кнize, А.В., Дмитренко, Н.В., Стрижаков, А.А. Эволюция эпизоотической ситуации по лихорадке долины Рифт // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропоознозов: труды Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 45-летию института 24-26 сентября / ГНУ ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. Часть 1. – С. 93-98.
4. Decision-Support Tool for Prevention and Control of Rift Valley Fever Epizootics in the Greater Horn of Africa / Bernard Mugenyu [et al] // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 2010. -Vol. 83 (Suppl 2). – P. 75–85.
5. F. Glyn Davies / The Historical and Recent Impact of Rift Valley Fever in Africa // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 2010. -Vol.83 (Suppl 2). P. 73-74.
6. Protection of Sheep against Rift Valley Fever Virus and Sheep Poxvirus with

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунологічних препаратів

a Recombinant Capripoxvirus Vaccine / Reuben K. Soi, Fred R. Rurangirwa, Travis C. McGuire, Paul M. Rwambo, James C. DeMartini, and Timothy B. Crawford // Clinical and Vaccine Immunology. 2010. – p. Vol. 17, No. 12. – P.1842-1849. 7. Rift Valley Fever: Recent Insights into Pathogenesis and Prevention / Hani Boshra [et al] // JOURNAL OF VIROLOGY. – 2011. – Vol. 85, No. 13. – P. 6098-6105. 8. The Deadly Dozen: 12 Diseases Global Warming Incubates/From Lyme Disease to Ebola Virus, The World Is Getting Sicker. [Електронний ресурс]. – 2008. – Режим доступу: <http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/deadly-dozen-global-warming-47100803#ixzz1UdUAav4g>. – Зарг.с екрана.

ANTIGENIC ACTIVITY OF INACTIVATED RIFT VALLEY FEVER VIRUS

Baluisheva V.I., Kapustina O.V., Zakutsky N.I., Imatdeinov I.R.

State Research Institution National Research Institute for Veterinary Virology and Microbiology of Russia (SRI NRIVVaMR), Pokrov, the Russian Federation

The paper presents some results obtained on a Rift Valley fever virus inactivation which allow production of an inactivated raw virus preserving its antigenic and immunogenic activity levels. The diethylenimine- and A-24-inactivated preparations induced complement-fixation and haemagglutination antibody synthesis at a rate of 1:256-512 and 1:512-1024, respectively on day 21 to 28 post their inoculation to mice or sheep. The vaccinated mice were resistant to challenge with a virulent virus strain at a dose of 1000 LD₅₀.

УДК 619:616.98:578.825.1

МІКРОМЕТОД РЕАКЦІЇ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСНОГО ЕНТЕРИТУ ГУСЕЙ

Білецька Г.В., Юрко П.С., Музика Н.М., Грибкова Н.П.

Інститут птахівництва НААН, с. Бірки

Вірусний ентерит гусей (ВЕГ) – висококонтагіозна хвороба, що характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту, серця, печінки, прогресуючим схудненням та високою летальністю молодняка гусей 4-30-добового віку. Захворювання широко розповсюджене в країнах, які займаються гусівництвом, у тому числі й в Україні [1, 2, 3].

Вірус легко передається аліментарним, аерогенним, контактним шляхами та трансваріально. Джерелом інфекції є хворі та загиблі гусенята, а також дорослі гуси-вірусоносії [4].

Важливою умовою боротьби з вірусним ентеритом є наявність достовірної інформації щодо розповсюдження цього захворювання в Україні, прогнозування його виникнення та своєчасна діагностика та профілактика. Одним із методів вивчення епізоотологічного статусу щодо інфекційних захворювань є проведення серомоніторингу.

В Україні для визначення серопозитивності до вірусного ентериту та проведення імуномоніторингу застосовуються реакція нейтралізації (РН) [5] та реакція непрямой гемаглютинації [2, 5], завершується розробка методу імуноферментного аналізу [6].

Серед методів імунодіагностики особливої уваги заслуговує реакція нейтралізації, оскільки вона є найбільш універсальною, високоспецифічною та використовується як еталон при оцінці інших реакцій в вірусології. Проте, постановка реакції потребує високої кваліфікації спеціалістів, вона трудомістка та затратна.

Метою досліджень було відпрацювати мікробаріант РН з метою його використання для контролю імунної відповіді на щеплення проти вірусного ентериту, що дозволить спростити та здешевити постановку реакції.

Матеріали та методи. Реакцію нейтралізації проводили з постійною дозою вірусу. Для проведення досліджень макро- та мікрометодами використовували культуру фібробластів ембріонів гусей (ФЕГ), виготовлену за загальноприйнятною методикою. Для макрометоду використовували пробірки, у які вносили 1,5 см³ ростового середовища. РН в мікробаріанті проводили в одноразових полістиролових культуральних планшетах з об'ємом ростового середовища 0,15 см³ (150 мкл). Дослідні сироватки інактивували за температури плюс 56 °С протягом 30 хвилин та готували розведення на стерильному середовищі 199 або Ігла ДМЕМ, починаючи з 1:10 до 1:5120. До кожного розведення сироватки додавали рівну за об'ємом кількість відтитрованого вакцинного штаму ВВS-99 вірусу ентериту гусей в дозі 1000 ТЦД₅₀. Суміш інкубували за температури плюс 37(±0,5) °С протягом 1 години. Потім суміш вносили в 4 лунки по 0,1 см³ (мікрометод) або в 4 пробірки по 1 см³ (макрометод) з культурою гусячих фібробластів та інкубували в СО₂-інкубаторі за температури плюс 37(±0,5) °С протягом 5-7 днів. Одночасно ставили контролю: 1) контроль вірусу – 4 лунки або пробірки, в які вносили вірус штаму ВВS-99 у дозі 1000 ТЦД₅₀ з'єднаним із середовищем у рівному об'ємі; 2) контроль дослідної сироватки – сироватку в розведенні 1:10 змішували із середовищем у рівному об'ємі, та суміш вносили в 4 лунки або пробірки з культурою клітин; 3) контроль середовища – 4 лунки або пробірки з незараженою культурою фібробластів. Для оцінки РН щоденно проводили мікроскопію інфікованої культури під малим збільшенням мікроскопу. За титр дослідної сироватки приймали те розведення, яке затримує розвиток ЦПЕ вірусу в 50 % інфікованих культур клітин.

Постановку реакції нейтралізації двома методами здійснювали з 19 сироватками крові, одержаних від гусей, які щеплювались дворазово перед початком несучості проти вірусного ентериту. Кров відбирали через 5 місяців після щеплення.

Результати досліджень. У ході постановки РН мікрометодом кількість витрачених матеріалів та робочого часу була значно менша в порівнянні із макрометодом. Так, кількість культуральних середовищ та дослідних сироваток відрізнялась у 10 разів, що дозволяє економити до 100 грн. при дослідженні 25 проб сироваток крові. Економія робочого часу спостерігалась за рахунок використання багатоканальних автоматичних піпеток та культуральних планшетів.

При порівнянні результатів постановки реакції нейтралізації макро- та мікрометодом не виявлено суттєвих відмінностей в титрах досліджуваних сироваток (табл.). При обчисленні наведених у таблиці результатів за статистичними методами достовірної різниці не встановлено, коефіцієнт кореляції становив 0,97.

На підставі одержаних даних підготовлені «Методичні рекомендації по постановці реакції нейтралізації мікрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей».

Висновки. 1. Розроблено мікрометод реакції нейтралізації та доведена можливість його використання на рівні з макрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей.

2. Підготовлені «Методичні рекомендації по постановці реакції нейтралізації мікрометодом для визначення антитіл проти вірусного ентериту гусей».

3. Постанова мікрометоду реакції нейтралізації дає можливість зменшити затрати матеріалів та робочого часу на постановку реакції.