

SELECTION OF THE METHOD OF PURIFYING ANTIGEN OF BACTERIA *SALMONELLA ENTERITIDIS* FOR INDIRECT ELISA

Dragut S.S., Stegnyy B.T.

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

According to the research there was selected method of purify antigen of bacterium *Salmonella Enteritidis* (SE) for indirect ELISA. There was found that the drug of liposaccharide antigen (LPS-AG) SE, received by treatment with phenol, is active and specific and can be used to develop a kit for ELISA for the detection of antibodies to this pathogen in chickens, and in animals if appropriate conjugate is used. There was assumed availability of this method for the reception LPS-AG not only for bacteria *Salmonella Enteritidis*, but also for other epidemiologically and epizootologically significant *Salmonella* serogroups.

УДК 619:616.98:578.823.2

ПОДБОР ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ РЕОВИРУСА ТИПА I

Ефимова М.А.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань, Российская Федерация

Реовирусы из семейства *Reoviridae* широко распространены и играют важную роль в патологии человека и животных. Отличительной особенностью реовирусов является наличие сегментированной двухцепочной РНК, способность к гемагглютинации и характер их репликации [1, 7].

Реовирусы вызывают цитопатический эффект (ЦПЭ) в культуре клеток KB, HeLa, BS/C-1, Vero, CV-1 и различных типов клеток обезьян [5, 6]. При выделении обычно используют клетки почек макака (Vero) и перевиваемые линии почек поросят (PK-15) или мышинные фибробласты («L») [2, 4]. По литературным данным реовирусы хорошо размножаются и вызывают цитопатический эффект на культурах многих видов приматов и домашних животных [3].

В связи с этим, целью исследований явилось изыскание оптимальной модели культуры клеток для получения вирусного сырья с высокой биологической активностью.

Материалы и методы исследований. Для исследований использовали реовирус типа I штамм «Reo I Lang» с гемагглютинирующим титром 1:32.

Перевиваемые культуры клеток – Vero, почки эмбриона коровы (MDBK), почки теленка (ПТ-80), легкие эмбриона коровы (ЛЭК), РК-15, почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13), для опытов использовали с полностью сформированным монослоем. Время культивирования зависело от проявления цитопатического действия (ЦПД). В случае отсутствия ЦПД время культивирования продолжалось до 7 суток.

Эффективность накопления реовируса в перевиваемых культурах клеток оценивали с учетом времени проявления ЦПД вируса и гемагглютинирующей активности (ГА) в 3 серийных пассажах.

Результаты исследований. По результатам исследований установлено, что адаптация реовируса в клеточных культурах Vero, MDBK, ПТ-80, РК-15, ВНК-21/13 наступала в течение 1–2 пассажей. Время появления ЦПД 48–96 часов. Характер проявления ЦПД на культуре клеток Vero представлен на рисунке.

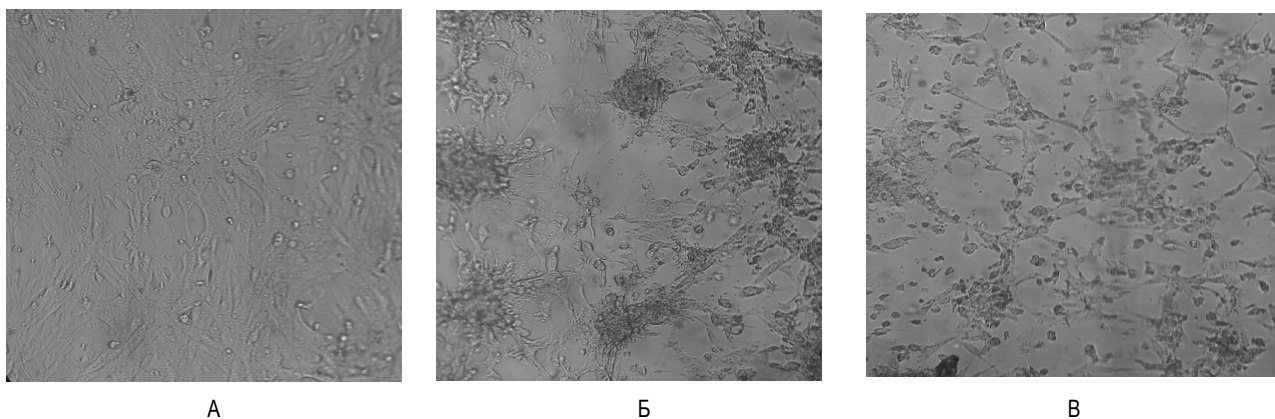


Рис. Перевиваемая культура клеток Vero до и после заражения реовирусом типа I (шт. «Reo I Lang»)

Примечание: А – до заражения; Б – после заражения через 72 часа; В – после заражения через 96 часов.

В период максимального проявления ЦПД гемагглютинирующий титр в указанных клеточных культурах составлял 1:32–1:64. Результаты опыта отражены в таблице.

Таблица – Чувствительность различных культур клеток к реовирусу типа I шт. «Reo I Lang»

Культура клеток	Время наступления ЦПД, ч	Титр ГА, обратная величина разведения, М±m, n=4
Vero	72-96	48,0±10,6
MDBK	72-96	72,0±23,2
ЛЭК	96	12,0±2,6
РК-15 «н/с»	72-96	96,0±21,3
РК-15 «э/с»	24-48	160,0±36,9
ВНК-21/13	48-72	64,0±26,1
ПТ-80	72-96	40,0±9,2

Примечание: «н/с» – нормальная сыворотка крупного рогатого скота; «э/с» – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

Накоплення вірусу с найбільшим гемаглютинируючим титром 1:128–1:256 походило на культурі кліток РК-15 с додаванням фетальної сыворотки крупного рогатого скота. При цьому час проявлення ЦПД скорочувався на 24–36 ч. Стимулююче діяння на репродукцію реовірусу також оказувало додавання в підтримуючу середу 10–20 мкг/см³ трипсина.

Менше придатною для репродукції реовірусу типу I оказалась перевидавана культура ЛЭК, на якій у перших трьох пассажах відмічалися невисокі показники інфекційної та гемаглютинируючої активності реовірусу в межах 1:8–1:16.

Висновки. Результати досліджень показали, що досліджувані перевидавані культури кліток: Vero, MDBK, ПТ-80, РК-15, ВНК-21/13, оказались чутливими до реовірусу типу I та можуть бути використані для отримання вірусу с високою біологічною активністю. По літературним даним культура кліток Vero является найбільш часто використовуваною при роботі з реовірусами, однак культура кліток РК-15, вирощена с додаванням фетальної сыворотки крупного рогатого скота забезпечувала репродукцію реовірусу типу I с більш високим гемаглютинируючим титром.

Список літератури

1. Berard, A. Mammalian reoviruses: propagation, quantification, and storage [Text] / A. Berard, K.M. Coombs // Current protocols in microbiology. – 2009. – Ch. 15. – 15 p.
2. The σ region of outer-capsid protein $\mu 1$ undergoes conformational change and release from reovirus particles during cell entry [Text] / K. Chandran [at al.] // J. Virol. – 2003. – Vol. 77. – P. 13361–13375.
3. Connolly, J.L. Virion disassembly is required for apoptosis induced by reovirus [Text] / J.L. Connolly, T.S. Dermody // J. Virol. – 2002. – P. 1632–1641.
4. The viral $\sigma 1$ protein and glycoconjugates containing $\alpha 2$ -3-linked sialic acid are involved in type 1 reovirus adherence to M cell apical surfaces [Text] / A. Helander [at al.] // J. Virol. – 2003. – Vol. 77. – P. 7964–7977.
5. Secretory immunoglobulin A antibodies against the outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches [Text] / A.B. Hutchings [at al.] // J. Virol. – 2004. – P. 947–957.
6. Islam, K.M.D. Adaptation of reovirus on Vero cell line [Text] / K.M.D. Islam, T. Ahmed, M.M. Ahasan // J. Animal Vet. Adv. – 2003. – Vol. 5. – P. 25.
7. Yago, K. Isolation of reovirus from nasal cavity and external ear in herd calves [Text] / K. Yago, M. Nishimura, M. Ishida // J. Japan Vet. Med. Assn. – 2006. – Vol. 18. – P. 43–46.

SELECTION OF SENSITIVE CELL CULTURES FOR REPRODUCTIONS OF REOVIRUS TYPE I

Efimova M.A.

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

It was studied in comparative aspect sensitivity effects cell culture lines Vero, MDBK, PT-80, LEK, PK-15, BHK-21/13 to type I reovirus to get the viral raw material with a high biological activity. Virus accumulation shows that the highest titers of gemagglutination titers place on the 15 PK-cell culture grown with the addition of fetal bovine serum. Stimulating effect on the reproduction of reovirus has also been adding trypsin in a supportive environment.

УДК 619:616.98:579.873.21

ВПЛИВ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ТА СПЕЦИФІЧНОСТІ ТУБЕРКУЛІНУ ДЛЯ ССАВЦІВ

Загородній А.І., Білушко В.В.

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

Баранов В.С.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

Ліофілізація або сублімаційне висушування у вакуумі попередньо замороженого біологічного матеріалу є одним з ефективних методів зворотного консервування мікроорганізмів і біопрепаратів. Завдяки цьому методу вдається досягти максимального збереження специфічних властивостей білків, а також мінімізувати процеси їх денатурації. При цьому, значно полегшується стандартизація біопрепаратів, спрощується їх зберігання та транспортування. Ліофілізовані препарати легко розчиняються у воді [1].

Однією з фармацевтичних форм виготовлення очищеного ППД-туберкуліну для ссавців або птиці є ліофілізат. Така форма виготовлення туберкуліну дозволяє стабільно зберігати діагностичні властивості цього алергену впродовж більш тривалого терміну ніж у формі стандартного розчину. Зокрема, слід зазначити, що на сьогодні, міжнародний стандарт туберкуліну для ссавців також випускається у ліофілізованому вигляді [2, 3].

Для контролювання якості вітчизняних комерційних серій туберкуліну для ссавців, використовують спеціально відібрану серію «Туберкуліну очищеного (ППД) для ссавців у стандартному розчині», яку виготовляють у формі рідини за технологією розробленою ННЦ «ІЕКВМ» і впровадженій у виробництво на Державному підприємстві «Сумська біологічна фабрика» [4]. У зв'язку з цим, для отримання національного стандарту туберкуліну для ссавців з більш стабільними властивостями в ННЦ «ІЕКВМ» також розроблено технологію виготовлення сухого (ліофілізованого) ППД-туберкуліну для ссавців, який зберігає біологічну активність і видову специфічність впродовж значно більшого терміну (до 5–6 років) ніж туберкулін, що виготовляється у стандартному розчині (2 роки).

Метою нашої роботи було дослідження біологічної активності виготовлених мікросерій сухого очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців, які зберігались впродовж 5,5 років.

Матеріали та методи досліджень. Порівняльні дослідження біологічної активності та специфічності 3-х дослідних мікросерій (С-1, С-2, С-3) «Туберкуліну сухого очищеного (ППД) для ссавців», виготовленого в ННЦ «ІЕКВМ» 08.2007 року проведені на 20-ти клінічно здорових морських свинках (живою масою 300–350 г), які не реагували на туберкулін. Дослідження проведено в умовах дослідно-експериментальної бази ННЦ «ІЕКВМ». Лабораторних тварин за 30 днів до проведення досліджень сенсibiliзували внутрішньом'язово зависю живої культури вакцинного штаму *M. bovis* BCG, а також *M. fortuitum* (для дослідження специфічності) у дозі 1,0 см³ на 1 гол. Бактеріальну суспензію (завись) виготовляли з розрахунку вмісту 1,0 мг біомаси мікобактерій у 1,0 см³ стерильного ізотонічного розчину.

Для контролю використовували туберкулін очищений (ППД) для ссавців у стандартному розчині (С-16, К-16) і туберкулін очищений (ППД) для птиці у стандартному розчині (С-13, К-13), які виготовлені ДП «Сумська біофабрика» 25.10.2011 і 16.03.2012 р. відповідно.

Дози введення дослідних мікобактеріальних алергенів – 25 МО у 0,1 см³ стерильного ізотонічного розчину, для контрольних алергенів – 25 МО у 0,1 см³ стандартного розчину.

Алергени вводили внутрішньокірно в депільовані й оброблені 70-вим етиловим спиртом ділянки шкіри з правого та лівого боку тварин. Облік алергічних реакцій у морських свинок проводили через 24 години після введення дослідних і контрольних алергенів шляхом визначення величини 2-х взаємно перпендикулярних діаметрів папули, що утворювалась на місці ін'єкції препаратів.

Маніпуляції з тваринами проводили керуючись принципами біоетики. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за методом критерію знаків [5].