

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 время проявлення ЦПД скорщалося на 24–36 ч. Стимулююче действо на репродукцію реовірусу також оказывало додавання в поддерживающую среду 10–20 мкг/см³ трипсина.

Менше придатною для репродукції реовірусу типу I оказалась перевиваемая культура ЛЭК, на которой в первых трех пассажах отмечались невысокие показатели инфекционной и гемаглютинирующей активности реовірусу в пределах 1:8–1:16.

Выводы. Результаты исследований показали, что изучаемые перевиваемые культуры клеток: Vero, MDBK, PT-80, PK-15, BHK-21/13, оказались чувствительными к реовірусу типа I и могут быть использованы для получения вируса с высокой биологической активностью. По литературным данным культура клеток Vero является наиболее часто используемой при работе с реовірусом, однако культура клеток РК-15, выращенная с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота обеспечивала репродукцию реовірусу типа I с более высоким гемаглютинирующим титром.

Список литературы

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].

Результати досліджень. Ліофілізований туберкулін 3-х дослідних мікросерій зберігався впродовж 5,5 років у герметично закупорених скляних флаконах у сухому темному місці за температури від 2 °С до 8 °С. Перед проведенням досліджень туберкулін мав вигляд сухої пористої маси світло-сірого кольору, повністю розчинявся у стерильному ізотонічному розчині протягом 2-х хвилин, концентрація водневих іонів у препараті (рН) становила 7,0–7,3, що відповідає вимогам нормативної документації [6].

Результати визначення порівняльної біологічної активності дослідних серій туберкуліну на морських свинках наведені в таблиці.

Таблиця – Інтенсивність алергічних реакцій на туберкулін у морських свинок, сенсibilізованих культурою вакцинного штаму *M. bovis* BCG

№	Величина папули у тварин через 24 год. після введення туберкуліну, мм					Наявність більшої (+), меншої (-) або однакової (=) реакції на дослідну серію туберкуліну ніж на контрольну (ППД для ссавців / ППД для птиці)		
	Дослідні серії туберкуліну			ППД для ссавців С-16 (контроль)	ППД для птиці С-13 (контроль)	С-1	С-2	С-3
	С-1	С-2	С-3					
1	7,5 (7×6)	8 (8×8)	7 (8×6)	7 (8×6)	4,5 (3×6)	+ /+	+ /+	+ /+
2	9,5 (10×9)	8 (7×9)	9 (9×9)	8,5 (8×9)	6 (7×5)	+ /+	- /+	+ /+
3	4,5 (5×4)	6 (7×5)	5 (6×4)	5,5 (7×4)	3,5 (3×4)	- /+	+ /+	- /+
4	9 (11×7)	10,5 (11×10)	8 (9×7)	8,5 (10×7)	5,5 (4×7)	+ /+	+ /+	- /+
5	6,5 (8×5)	8,5 (8×9)	7 (9×5)	6,5 (8×5)	5 (5×5)	= /+	+ /+	+ /+
6	10,5 (9×12)	8,5 (9×8)	11 (10×12)	9 (9×9)	6,5 (6×7)	+ /+	- /+	+ /+
7	7 (7×7)	6 (7×5)	7 (8×6)	8 (9×7)	-	- /+	- /+	- /+
8	14,5 (15×14)	11,5 (12×11)	11 (10×12)	14 (14×14)	7,5 (7×8)	+ /+	- /+	- /+
9	13 (12×15)	12,5 (12×13)	14,5 (12×17)	15 (12×18)	5,5 (6×5)	- /+	- /+	- /+
10	5 (5×5)	5 (6×4)	5 (5×5)	7 (5×9)	-	- /+	- /+	- /+
Σ	87,0	84,5	84,5	89,0	44,0			
M ± m	8,7±0,95	8,4±0,75	8,4±0,95	8,9±0,95	4,4±0,40			

Примітка: вірогідність результатів визначення біологічної активності дослідних мікросерій сухого очищеного туберкуліну (ППД) для ссавців становить 95–97,5 %.

Із даних таблиці видно, що алергічні реакції у морських свинок, сенсibilізованих живою культурою вакцинного штаму BCG, були неоднаковими. Так, максимальний розмір папули у тварин через 24 год. після введення першої дослідної мікросерії туберкуліну (С-1) складає 14,5 мм, а мінімальний – 5 мм (таблиця 1). Середнє значення при цьому становить (8,7±0,95) мм. Відповідні показники щодо другої та третьої дослідних мікросерій (С-2, С-3) знаходяться у межах 12,5 мм і 5 мм, що у середньому становить (8,4±0,75) мм, а також 14,5 мм і 5 мм: середній показник – (8,4±0,95) мм.

У сумарному значенні величина папул (Σ) після введення алергенів на мікросерію № 1 становила 87 мм, на мікросерію № 2 – 84,5 мм, на мікросерію № 3 – 84,5 мм, а на контрольну серію туберкуліну для ссавців (С-16) – 89 мм (M±m = 8,9±0,95), туберкуліну для птиці (С-13) – 44 мм (4,4±0,4).

Слід зазначити, що при статистичній обробці отриманих результатів за методом критерію знаків (таблиця) вірогідної різниці, яка свідчила б про переважність однієї з серій туберкуліну над іншою, не встановлено, що свідчить про збереження біологічної активності туберкуліну сухого очищеного (ППД) для ссавців. Водночас, усі алергічні реакції на туберкулін для ссавців, як дослідних, так і контрольних серій переважали за інтенсивністю алергічні реакції на введення туберкуліну для птиці. У 2-х лабораторних тварин реакції на туберкулін для птиці випадали. При дослідженні ліофілізованого туберкуліну у гетерологічній системі з застосуванням для сенсibilізації морських свинок (n=10) мікобактерій виду *M. fortuitum*, встановлено, що в сумарному відношенні розмір алергічних реакцій на введення туберкуліну для птиці ((86±0,69) мм) вірогідно перевищував відповідний показник після введення дослідних серій туберкуліну для ссавців ((48±0,41) мм). При цьому, середня величина папули після введення туберкуліну для ссавців не перевищувала 5,0 мм. Дані результати вірогідно свідчать про специфічність дослідних мікросерій туберкуліну.

Висновок. Встановлено, що виготовлені дослідні мікросерії сухого очищеного (ППД) туберкуліну для ссавців є біологічно активними, специфічними та стабільно зберігають відповідні властивості впродовж 5,5 років.

Список літератури

- Шаров, А. Н. Туберкулёз: ветеринарные препараты [Текст] / А.Н. Шаров. – М. : Колос, 1981. – С. 24.
- Козлов, В.Е. Оценка активности национального стандарта туберкулина (ППД) для млекопитающих относительно 1-го международного стандарта туберкулина (PPD) bovine [Текст] / В.Е. Козлов, В.М. Безгин, К.В. Шумилов // Вет. патология. – 2004. – № 1–2 (9). – С. 85–89.
- Козлов, В.Е. Аллергены для диагностики туберкулёза. Совершенствование производства и стандартизация [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук / В.Е. Козлов ; [ВИЭВ]. – М., 2007. – 32 с.
- ППД-туберкулін для ссавців виробництва Сумської біофабрики [Текст] / А.І. Завгородній [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 1. – С. 34–35.
- Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика [Текст] / П.Ф. Рокицкий. – Минск : Высшая школа, 1973. – 320 с.
- Туберкулін сухий очищений (ППД) для ссавців (Національний стандарт) ТУ У 24.4-00497087-107:2011.

INFLUENCE OF LIOPHILIZATION PROCESS ON THE SAFETY OF ACTIVITY AND SPECIFICITY OF TUBERCULIN FOR MAMMALIANS

Zavgorodniy A.I., Bilushko V.V.

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

Baranov B.S.

State Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv

The results of research experiments on laboratory animals concerning safety of the main indicators of diagnostic performance (biological activity, specificity) of experimental micro series of dry purified tuberculin (PPD) for the mammals after prolonged storage are presented in the paper.

УДК 636.09:616.98

РОЗРОБКА ТА ВИПРОБУВАННЯ «НАБОРУ ТЕСТ-ШТАМІВ *LISTERIA SPP.* ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ CAMP-TEST ТА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ»

Ковтун В.А.*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Лістеріоз, як одна з емерджентних зоонозних харчових інфекцій, потребує особливої уваги з боку ветеринарних і медичних працівників. Актуальність підвищеної уваги до цього захворювання зумовлена зростанням питомої ваги лістеріозу в інфекційній патології та збільшенням кількості зареєстрованих випадків у людей; недооцінкою рівня ризику виникнення та розповсюдження лістеріозу не лише з продуктами харчування, а й з бактеріоносіями; загибеллю сільськогосподарських тварин і витратами на профілактичні заходи, значними економічними збитками від захворюваності, зниженням продуктивності [1]. Це зумовлює необхідність науково-методичного удосконалення системи виявлення, оцінки та контролю цих ризиків на всіх етапах моніторингу. На жаль, в Україні моніторинг багатьох емерджентних інфекцій проводиться за допомогою імпортованих засобів діагностики. Тому, розроблення та застосування вітчизняних діагностикумів, як однієї із складових системи моніторингу, є необхідним для розробки комплексних національних програмних досліджень емерджентних інфекцій.

Мета роботи – розробка та випробування набору тест-штамів *Listeria spp* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ.

Матеріали та методи досліджень. Розробку «Набору тест-штамів *Listeria spp* для проведення CAMP-test та контролю якості поживних середовищ» проводили із використанням виділених нами штамів лістерій: *Listeria seeligeri 0811s*, *Listeria ivanovii 0811i* [2]. А також штамів із Національного центру штамів мікроорганізмів: *Listeria monocytogenes 92U002*, *Listeria monocytogenes Mon02*, *Listeria innocua 92U005*, *Staphylococcus aureus KV25*, *Rhodococcus equi 1*, *Escherichia coli Esi 5*.

Перед початком досліджень вищезгадані штами було перевірено на відповідність паспортним характеристикам основних культурально-морфологічних, тинкторіальних, біохімічних та гемолітичних властивостей.

Культуральні, морфологічні, біохімічні та гемолітичні властивості досліджували за загальноприйнятими методиками [3]. Постановку CAMP-test проводили згідно ДСТУ ISO 11290 з деякими змінами: додано культуру *Listeria seeligeri 0811s* до контрольних штамів і подовжено термін культивування від 24 до 48 годин [4].

Для перевірки якості поживних середовищ використовували *Listeria monocytogenes 92U002* (позитивний контроль) та *Escherichia coli Esi 5* (негативний контроль), дослідження проводили відповідно до ДСТУ ISO 11133.

Усі дослідження проводили у п'яти повторах.

Розроблений набір було перевірено за наступними показниками: зовнішній вигляд та колір; наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів (ампул), щільність закупорки, етикетування; стерильність (відсутність контамінації сторонньою бактеріальною і грибною мікрофлорою); специфічність (визначення типовості росту на середовищах та визначення гемолітичних властивостей) та активність (визначення концентрації мікробних клітин).

Стерильність (відсутність контамінації сторонньою бактеріальною та грибною мікрофлорою) визначали згідно однойменного ДСТУ 4483:2005.

Специфічність (типовість росту на середовищах) визначали шляхом висіву культур на поживні середовища МПБ (з додаванням 5 % сироватки коня та 1-го відсотка 40 %-го розчину глюкози), МПА та селективні Palsam і Oxford. Культивування проводили протягом 24 годин за температури 37±1 °С. З отриманих добових культур з щільного середовища та рідкого виготовляли мазки та фарбували їх за Грамом.

Гемолітичні властивості та проведення CAMP-test визначали шляхом культивування культур за температури 37±1 °С протягом 24–48 годин на готовому до використання комерційному стандартизованому кров'яному середовищі. Визначення гемолітичних властивостей та постановку CAMP-test проводили згідно ДСТУ ISO 11290 з деякими змінами: *Listeria seeligeri 0811s* було додано до тест-штамів для проведення CAMP-test з терміном культивування від 24 до 48 годин [5, 6].

Активність (концентрації мікробних клітин) визначали методом граничних розведень за загальноприйнятою методикою. Культивування проводили протягом 24 годин за температури 37±1 °С.

Результати досліджень. У результаті аналізу паспортних даних було встановлено, що для досягнення поставленої мети кандидатами у набір можуть бути: *Listeria seeligeri 0811s*, *Listeria ivanovii 0811i*, *Listeria monocytogenes 92U002*, *Listeria innocua 92U005*, *Staphylococcus aureus KV25*, *Rhodococcus equi 1* та *Escherichia coli Esi 5*.

Культури *Listeria spp.* у рідкому поживному середовищі МПБ через 24–48 годин культивування утворювали ріст у вигляді помутніння. На щільному поживному середовищі МПА культури мали вигляд округлих, напівпрозорих, випуклих колоній S-форми молочно-білого кольору з цільними краями та гладенькою поверхнею. На селективних середовищах Palsam та Oxford культури давали ріст у вигляді темно-зелених та темно-сірих колоній з чорним ореолом відповідно (Рис. 1 та Рис. 2).

Бактеріальні клітини під мікроскопом мали вигляд грампозитивних дрібних коротких паличок правильної форми із заокругленими кінцями, що були розміщені в мазках поодинокі або в коротких ланцюжках у вигляді римської літери «V».

* – Науковий керівник – доктор вет. наук, професор, член-кореспондент НААН Ушкалов В.О.