

8. Chapter 2.3.13. Marek's disease [Text] // Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. – 6<sup>th</sup> ed. – OIE, 2008. – P. 566-575.
9. Payne, L. N. Pathogenesis of Marek's disease: recent development [Text] / L.N. Payne // Proc. 19<sup>th</sup> World Poultry Congr. (Amsterdam, Netherlands, 20-24 Sept., 1992.). - Amsterdam, 1992. – P. 189-194.
10. Witter R.L. Marek's disease virus: The characteristics of new strains [Text] / R.L. Witter // Proc. 19<sup>th</sup> World Poultry Congr. (Amsterdam, Netherlands, 20-24 Sept., 1992.). - Amsterdam, 1992. – P. 238-240.
11. Witter R. L. Very virulent Marek's disease viruses: impotence and control [Text] / R. L. Witter // Worlds Poultry. – 1989. – № 5. – P. 45.

### DEFINITION HARMLESSNESS PROTOTYPES TRIVALENT VACCINE AGAINST MAREK'S DISEASE

**Stegniy B.T., Stegnyy M.Y., Sostin D.D., Zaitsev D.S.**

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

*The article presents the results of studies on the harmlessness of the trivalent vaccine prototypes using Marek's disease virus isolates 1st serotype 3/11, 4/11, 5/11, which were tested for day-old chicks.*

*During the experiment, the vaccinated chickens has not been a single case of post-vaccination complications. Clinical monitoring of vaccinated chickens indicate that the experimental vaccine samples harmless use of the drug does not cause adverse effects. Namely, in the experimental chickens do not register and swelling at the injection site abscesses, deterioration of general condition, retarded growth and development. During follow-up, the chickens have not been reported any adverse reactions and physiological deviations from the norms characteristic of this species.*

*The vaccine can be considered harmless, because during the observation period, all test animals survived without any local and symptomatic manifestations caused by the vaccine. Pathological changes characteristic of Marek's disease at autopsy experimental chickens were also not recorded.*

**Keywords:** isolate, Marek's disease virus, control harmless, day-old chicks, vaccine-pathological changes.

УДК 619:616.98:578.828.11:578.74:636.2

### ОСАДЖЕННЯ АНТИГЕНІВ ВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У ДВОФАЗНІЙ СИСТЕМІ ВОДОРозчинНИХ ПОЛІМЕРІВ

**Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'ягих Н.В.**

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

*Метод осадження у двофазній системі водорозчинних полімерів (0,2 % декстрану та 7,0 % ПЕГ) дозволяє отримати культуральні антигени ВЛВРХ, які за вмістом загального білку та специфічною активністю в РІД у 1,52–2,48 рази перевищують контрольні антигени, отримані традиційним способом.*

**Ключові слова:** вірус лейкозу ВРХ, антиген, осадження, метод, РІД

Загальновідомо, що ефективність серологічного методу діагностики інфекційних захворювань залежить від рівня специфічності засобу, що використовується. Досягнення високого рівня ефективності серологічних методів діагностики лейкозу може бути забезпечене лише при застосуванні високоспецифічних антигенів ВЛКРС. Антигени ВЛВРХ, які використовують з діагностичною метою, продукуються лініями клітин, хронічно інфікованими збудником лейкозу FLK-BLV чи PO714 (культуральною антиген), або клонами мікроорганізмів, у геном яких інтегровані відповідні фрагменти вірусу лейкозу (рекомбінантний антиген).

Кількісні та якісні показники культуральних глікопротеїдних антигенів ВЛВРХ залежать від багатьох технологічних чинників, найважливішими серед яких є методи виділення.

Існують методи виділення та фракціонування макромолекулярних сполук та вірусів з використанням водних розчинів полімерів [1]. Застосування рідких двофазних систем полімерів було апробовано для виділення таких ретровірусів та їх антигенів, як HIV, SIV, FeLV [2, 3, 4]. Також доведено придатність даної методики для концентрування та очищення ВЛВРХ [5, 6]. Це є особливо актуальним для напрацювання антигену ВЛВРХ з метою його використання в реакціях ІФА.

Крім того, у попередніх дослідях більш активні культуральні антигени нами було отримано на клітинах FLK-BLV з використанням поживних середовищ, модифікованих додаванням активних форм кисню (перекису водню) [7].

**Метою** наших досліджень було відпрацювання методу отримання культуральних антигенів ВЛВРХ на середовищах модифікованого складу з застосуванням методу очищення за допомогою двофазних систем полімерів.

**Матеріали та методи.** Використовували перещеплювану лінію клітин нирки ембріону вівці, хронічно інфіковану ВЛВРХ (FLK-BLV). Клітини FLK-BLV вирощували за загальноновживаними методиками

у флаконах об'ємом 1500 см<sup>3</sup>. Поживне середовище для вирощування культури клітин складалось з 45 % середовища Ігла, 45 % середовища 199, 10 % сироватки крові ВРХ, пеніциліну 100 ОД/см<sup>3</sup> та гентаміцину 40 мг/см<sup>3</sup> або додатково вміщувало 10 мкМ перекису водню [7]. Отриману культуральну рідину перевіряли на стерильність бактеріологічними методами, піддавали 2-разовому заморожуванню-відтаюванню, осаджували 30 хвилин у режимі 3000 об/хв. для звільнення від клітинного детриту, додавали натрію етилмеркурій саліцилат до кінцевої концентрації 1:10000. У підготовленій у такий спосіб культуральній рідині визначали вміст загального білку за методом Бредфорд [8]. Далі частину культуральної рідини концентрували на розподільному апараті АР2 до 1/10 від початкового об'єму.

Експериментальні антигени ВЛВРХ для РІД виготовляли з культуральної рідини та її концентрату методами осадження у двофазній системі водорозчинних полімерів у порівнянні з традиційним методом осадження за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ).

Для отримання експериментального культурального антигену методом фракціонування за допомогою двофазної системи полімерів вірусвміщуючий матеріал (В) – культуральну рідину, яку було отримано на поживних середовищах традиційного або модифікованого складу, або її концентрат – в стерильних умовах додавали до системи з 0,2 % декстрану (Д) та 7,0 % ПЕГ 6000. Відпрацьовували різні способи внесення та концентрації вірусвміщуючого матеріалу, а також режими осадження вірусного білку.

Контрольні антигени осаджували з культуральної рідини або її концентрату в стерильних умовах за допомогою 7,0 % ПЕГ 6000.

Для визначення активності отриманих культуральних антигенів застосовували реакцію імунодифузії (РІД), яку проводили з використанням контрольних позитивної та негативної діагностичних сироваток з «Набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)» за ТУУ 24.4. – 00497087-647-2002. Експериментальні та контрольні антигени досліджували в нативному стані та у титрах 1:2–1:6. Визначали кінцевий титр та робоче розведення антигенів. Постановку реакції та облік її результатів проводили згідно «Листівки-вкладки до набору компонентів сухих для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії» (№ 3272-14-052504/08-1/0 від 18.03.08) у 2 повторах на чашках Петрі з використанням прямокутного штампю.

**Результати досліджень.** З метою порівняльних досліджень провели три серії експериментів.

За першою схемою використовували неконцентрований вірусвміщуючий матеріал, усі компоненти системи додавали у наступній послідовності: Д+ПЕГ+В. За другою схемою: Д+В+ПЕГ. Як контроль застосовували систему для отримання антигену за традиційною методикою з додаванням ПЕГ (В+ПЕГ). За результатами проведених експериментів доведено, що вміст загального білку та кратність концентрування матеріалу за даним показником, а також специфічна активність антигенів, отриманих за першою схемою, були вищими (таблиця 1). Крім того, вищеозначена схема була більш технологічно придатною. Для подальших експериментів було відібрано першу схему складання двофазної системи полімерів.

**Таблиця 1** – Способи складання двофазних систем водорозчинних полімерів

ч/ч	Склад системи	Вірусвміщуючий матеріал сконцентровано за загальним білком, разів	Активність антигену, РІД
1	Д+ПЕГ+В	8,0	++++
2	Д+В+ПЕГ	6,0	+++
3	В+ПЕГ	6,0	++

Разом з цим визначали вплив тривалості осадження в системі полімерів на показники якості антигену. Для цього системи Д+ПЕГ+В витримували за температури 4 °С протягом 24 та 72 годин. Подальше виділення антигену в таких системах проводили, як вказано вище. У результаті встановлено, що антигени, отримані в системі Д+ПЕГ+В після 72 годин витримання, були більш активними в РІД (таблиця 2).

**Таблиця 2** – Режими осадження антигенів у двофазній системі водорозчинних полімерів

ч/ч	Склад системи, режим осадження	Вірусвміщуючий матеріал сконцентровано за загальним білком, разів	Активність антигену, РІД
1	Д+ПЕГ+В, 24 години	9,2	+++
2	Д+ПЕГ+В, 72 години	8,3	++++

З урахуванням результатів виконаних досліджень подальші експерименти проводили з застосуванням системи Д+ПЕГ+В, яку витримували протягом 72 годин.

У наступній серії експериментів вивчали вплив концентрації вірусвміщуючого матеріалу, отриманого з застосуванням поживних середовищ, модифікованих додаванням перекису водню, на ефективність осадження антигену в системі полімерів. З цією метою в системі Д+ПЕГ+В осадженню піддавали:

1) культуральну рідину перещеплюваної культури клітин FLK-BLV з вмістом загального білку 1675 мкг/см<sup>3</sup>, попередньо дворазово дефростовану, звільнену від клітинного детриту та консервовану натрію етилмеркурій саліцилатом;

2) 10-кратний від базового об'єму концентрат підготовленої у такий спосіб культуральної рідини з вмістом загального білку 10500 мкг/см<sup>3</sup>.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що при використанні культуральної рідини без попереднього концентрування в системі полімерів утворюються три фази – щільний осад, рідка опалесцююча інтерфаза в'язкої консистенції та рідка прозора надосадова рідина. У разі використання 10-кратного концентрату культуральної рідини в системі полімерів інтерфаза не утворюється. Кожну з отриманих фаз (осад, інтерфаза, надосад) відбирали окремо та досліджували в них вміст загального білку та специфічну активність в РІД. Відомості про показники якості отриманих антигенів наведено у таблиці 3.

**Таблиця 3 – Властивості антигенів, отриманих в двофазній системі водорозчинних полімерів**

ч/ч	Базовий матеріал	Вміст загального білку, мкг/см <sup>3</sup>	Порівняння кількості загального білку відносно базового матеріалу, разів	Активність антигену, РІД
<b>Концентрат</b>				
5	Д+ПЕГ+В, Осад	19750	1,88	+++
6	ПЕГ, Осад	14000	1,33	++
7	Д+ПЕГ+В, Надосад	5500	0,52	-
8	ПЕГ, Надосад	6150	0,58	-
<b>Культуральна рідина</b>				
9	Д+ПЕГ+В, Осад	28500	17,01	++++
10	ПЕГ, Осад	11500	6,86	+
11	Д+ПЕГ+В, Надосад	1150	0,68	-
12	ПЕГ, Надосад	1460	0,87	-
13	Д+ПЕГ+В Дослід, Інтерфаза	1600	0,95	-

Отримані результати свідчать, що в системі полімерів осадження білку з вірусвміщуючої рідини проходить більш інтенсивно, ніж з застосуванням ПЕГ. Так, для концентрату вірусвміщуючої рідини, виготовленої на модифікованих поживних середовищах, отриманий антиген вміщує загального білку в 1,41 рази більше, ніж антиген, осаджений за допомогою ПЕГ. У той же час вміст загального білку надосадової рідини в даному експерименті з застосуванням системи полімерів складає 0,89 від цього показника, підрахованого для надосадової рідини після використання ПЕГ. Для культуральної рідини це співвідношення складало 2,48 та 0,78 відповідно.

Найважливішим було те, що антигени, які було осаджено за допомогою двофазних систем полімерів, порівняно з антигенами, осадженими за допомогою ПЕГ, мали більшу активність в РІД. Особливо це стосується антигенів, отриманих з культуральної рідини.

Таким чином, наші дослідження підтвердили переваги методу осадження антигенів ВЛВРХ у двофазній системі водорозчинних полімерів у порівнянні з осадженням із застосуванням ПЕГ.

**Висновок.** Антигени ВЛВРХ, очищені у двофазній системі полімерів, яка складається з 0,2 % декстрану та 7,0 % ПЕГ 6000 у РІД перевищують контрольні антигени за специфічною активністю та за вмістом загального білку в 1,52–2,48 рази.

#### Список літератури

1. Пер-Оке Альбертсон Разделение клеточных частиц и макромолекул / М., Мир. – 1974. – 381 с.
2. Extraction of HIV-1 in Aqueous Two-Phase Systems To Obtain a High Yield of gp120/ Hammar L., Gilljam G. //AIDS research and human retroviruses. – 1990, Vol. 6, No 12. – P. 1379-1388.
3. Purification of simian immunodeficiency virus, SIV<sub>MAC251</sub>, and of its external envelope glycoprotein, gp 148/ Gilljam G., Siridewa K., Hammar L. //J. of Chromatography A. – 1994. – No 675. – P. 89-100.

4. Concentration and purification of feline leukaemia virus (FeLV) and its outer envelope protein gp70 by aqueous two-phase system/Hammar L., Eriksson S., Malm K., Morein B. //J. Virol. Meth. – 1989. – No 24. – P. 91-102.
5. Способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота// Гулюкин М.И., Иванова Л.А., Коромыслов Г.Ф., Замараева Н.В. //Патент РФ № 2185854, 2002.
6. Hammar L, Merza M., Malm K., Eriksson S., Morein B. The use of aqueous two-phase systems to concentrate and purify bovine leukemia virus outer envelope protein gp51. / Biotechnology and biochemistry. -1989.-11.-296-306.
7. Шаповалова О.В. Дослідження антигенпродукуючої активності перещеплюваної культури клітин FLK-BLV під впливом активних форм кисню// Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'ягих Н.В. // Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – X., 2013. – Вип. 97. – С. 560-562.
8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Мн.:Беларусь, 2000. – Т.1. – С. 198-199.

#### BOVINE LEUKEMIA VIRUS ANTIGEN PRECIPITATION IN TWO-PHASE SYSTEM OF WATER-SOLUBLE POLYMERS

**Shapovalova O.V., Gorbatenko S.K., Kuznetsova O.V., Myagkich N.V.**

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

*Testing methods of obtaining BLV cultural antigens using modified nutrient media and precipitation in two-phase system of water-soluble polymers.*

*Materials and Methods. BLV experimental antigens were prepared from the FLK-BLV culture fluid on conventional nutrient media or modified with 10 mM of hydrogen peroxide. The culture fluid and its concentrate was precipitated in the two-phase system of water-soluble polymers (0,2 % dextran and 7,0 % PEG) in comparison with 7 % PEG precipitation. The antigens activity was determined in AGID.*

*Results. Virus-containing material precipitation regimes in the polymers system – influence of concentration and components adding order, the duration of the precipitation were worked out.*

*It is proved that the concentration of total protein and specific activity of the antigens exceeded the antigens obtained by precipitation with PEG.*

*Conclusion. The BLV antigens purified in a two-phase system of water-soluble polymers, which contain 0,2 % dextran and 7,0 % PEG 6000, exceed control antigens in the AGID specific activity and total protein content by 1,52–2,48 times.*

**Keywords:** bovine leukemia virus, antigen, precipitation, method, AGID