

УДК 619:578.832.1:636.5

КОМІСІЙНІ ВИРОБНИЧІ ВИПРОБУВАННЯ ВІТЧИЗНЯНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ГРИПУ А ПІДТИПІВ Н1-Н14 В РЕАЦІЇ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ

Стегній Б.Т., Майорова К.Ф., Музика Д.В., Стегній М.Ю.

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

Ушкалов В.О., Бабкін М.В., Блоцька О.Ф.

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

Дедок Л.А.

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

Незважаючи на те, що на боротьбу з грипом птиці були спрямовані великі зусилля, проблема все ще лишається актуальною для України, оскільки її географічне положення співпадає зі шляхами міграції диких перелітних птахів, які відіграють головну роль у переносі та розповсюдженні інфекції [1].

Зазначимо, що високопатогенний грип птиці входить до списку особливо небезпечних вірусних захворювань тварин і птиці Міжнародного епізоотичного бюро. Усі країни члени МЕБ обов'язково повинні повідомляти про випадки реєстрації високопатогенного грипу птиці та будь-які випадки ідентифікації підтипів Н5 і Н7 [2].

Складна епізоотична ситуація в світі, зокрема і в Україні, щодо грипу птиці в 2005–2008 роках, необхідність проведення постійного моніторингу та контролю циркуляції цього захворювання, а також відсутність зареєстрованих вітчизняних засобів специфічної діагностики спонукали фахівців Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» розпочати наукові дослідження щодо створення вітчизняної тест-системи для специфічної діагностики грипу птиці різних підтипів в РЗГА. Результатом цих наукових досліджень стала розробка технології виготовлення «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА». Для проведення цілого комплексу лабораторних випробувань було виготовлено декілька експериментальних серій препарату. Після їх успішного завершення були проведені міжвідомчі комісійні виробничі випробування тест-системи на базі відділу вивчення хвороб птиці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та у відділі біотехнології та контролю якості вірусних препаратів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів. У випробуваннях приймали участь представники ННЦ «ІЕКВМ», ДНКІБШМ, Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Матеріали та методи досліджень. Комісійні випробування проводили згідно наказу Головного державного інспектора ветеринарної медицини України № 95 від 6 серпня 2008 року та методики випробувань, що була розглянута та схвалена Експертною комісією ДНКІБШМ протокол № 21 від 29 травня 2008 року. З метою проведення комісійних випробувань були використані: 1. «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в реакції затримки гемаглютинації», розробки ННЦ «ІЕКВМ» (м. Харків). 2. Референті сироватки крові виробництва Національної та МЕБ Референс-лабораторії з грипу та ньюкаслської хвороби Інституту Зоопротілактики (National, OIE and FAO Reference Laboratory of Avian Influenza and Newcastle Disease Instituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, м. Падуа, Італія), таблиця 1. 3. Негативний контрольний антиген – екстраембріональна рідина курячих ВПФ ембріонів 12-добової інкубації (виробництва фірми Ломан). 4. Антиген вірусу ньюкаслської хвороби птиці (ВПФ) специфічний ліофілізований (виготовлений ДП «Дніпропетровська біофабрика»). 5. 1 % суспензія еритроцитів півня. 6. Фосфатно-сольовий буфер, рН 7,2. 7. Сироватки та жовтки яєць диких птахів одержані у заповіднику «Асканія-Нова», Затоки Сиваш Херсонської та Запорізької областей та в місті Харків (таблиця 2).

Таблиця 1 – Список референтних сироваток крові

№	Найменування сироватки крові	Належність до підтипу	Найменування штаму вірусу
1	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H1N1 subtype	H1N1	A/sw/It/558/86
2	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H2N3 subtype	H2N3	A/Dk/Germ/1215/73
3	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H3N8 subtype	H3N8	A/Psitt/It/2873/00
4	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H4N8 subtype	H4N8	A/Cockatoo/Eng/72
5	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H5N3 subtype	H5N3	A/duck/It/775/04
6	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H6N2 subtype	H6N2	A/TY/Canada/65
7	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H7N3 subtype	H7N3	A/ty/It/9289/V02
8	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H8N4 subtype	H8N4	A/turk/ONT/6118/68
9	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H9N7 subtype	H9N7	A/turk/Scotland/1/70
10	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H10N1 subtype	H10N1	A/Ostrich/SA/01
11	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H11N9 subtype	H11N9	A/Duck/ Memphis/546/174
12	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H12N5 subtype	H12N5	A/Duck/Alberta/60/76
13	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H13N6 subtype	H13N6	A/Gull/Maryland/704/77
14	Reference antiserum against Avian Influenza, type A H14N5 subtype	H14N5	A/Mallard/Gurjev/263/82
15	Reference antiserum against Newcastle disease virus	PMV-1	Ulster 2C

Таблиця 2 – Сироватки та жовтки яєць диких птахів одержані у заповіднику «Асканія-Нова», Затоки Сиваш Херсонської та Запорізької областей та в місті Харків

Сироватки та жовтки яєць диких птахів	
Сироватки крові гуски білолобої	Жовток яйця крижня
Сироватка крові галагаза	Жовток яйця огаря
Сироватка крові крижня	Жовток яйця чоботоря
Сироватка крові голуба	Жовток яйця коловодника болотного
Сироватка крові ластівки	Жовток яйця голуба

Результати досліджень. Комісійні випробування проводили за наступними показниками: зовнішній вигляд; наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів; герметичність закупорки; наявність вакууму; розчинність антигенів та сироваток; стерильність компонентів тест-системи; рН фосфатно-сольового буферу; повнота інактивації антигенів; гемаглютинуюча активність антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РГА; специфічність антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 та сироваток крові, що вміщують антитіла до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА; активність позитивних до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 та негативної сироваток крові в РЗГА.

При визначенні зовнішнього вигляду, встановлено, що антигени вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 інактивовані, сухі – це суха пориста маса, світло-жовтого або жовто-сірого кольору. Позитивні сироватки крові курей з антитілами до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 та негативна сироватка крові курей без антитіл до вірусу грипу А, суха – це суха дрібнопориста маса білого або жовто-рожевого кольору. Солі фосфатно-сольового буфера (ФСБ) для розведення сироваток та антигенів – порошок білого кольору. Усі флакони мали відповідне маркування, де вказано: назву підприємства-виробника, адресу та його товарний знак, найменування тест-системи, назву компонентів тест-системи, номер серії, номер контролю, термін придатності (місяць, рік), титр біологічної активності діагностичного препарату, позначення технічних умов, що відповідає вимогам ТУ У.

При визначенні наявності сторонніх домішок, тріщин флаконів герметичності закупорки та наявності вакууму не виявлено сторонніх домішок, тріщин флаконів. Усі флакони були герметично закупорені. У флаконах під дією апарату Д'Арсонваль з'являлося фіолетово-блакитне світіння, яке супроводжувалося характерним потрескуванням, що відповідає вимогам ТУ У.

При визначенні розчинності антигенів, сироваток і визначення їх стерильності, встановлено, що антигени та сироватки повністю розчинялись впродовж 1 хвилини без пластівців та осаду у ФСБ (2 см³ ФСБ для антигену, та 0,5 см³ ФСБ для сироватки), що відповідає вимогам ТУ У.

Визначення стерильності проводили відповідно до ДСТУ 4483. За результатами випробувань антигени, позитивні та негативна сироватки були стерильними, що відповідає вимогам ТУ У.

Визначення рН фосфатно-сольового буферу проводили відповідно до інструкції, що додається до рН-метру. Виготовлення ФСБ проводили згідно листівки-вкладки.

За результатами досліджень встановлено, що рН фосфатно-сольового буфера для розведення сироваток та антигенів становив 7,2, що відповідає вимогам ТУ У.

Особлива увага була приділена визначенню повноти інактивації антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14, тому що цей показник характеризував безпечність біопрепарату. Контроль повноти інактивації антигенів визначали зараженням 9 денних курячих ембріонів (КЕ) зі статусом ВПФ (безтитильні, вільні від патогенної мікрофлори). Для кожного антигену брали по 5 КЕ. Зараження проводили в алантоїсну порожнину антигенами розведеними у співвідношенні 1:10 стерильним ФСБ у дозі 0,2 см³. Ембріони інкубували за температури 37 °С протягом 120 годин. Було проведено три «сліпих» пасажі. Після кожного пасажу відібрану алантоїсну рідину досліджували в РГА на наявність гемаглютинації.

Встановлено, що за результатами трьох послідовних «сліпих» пасажів антигени тест-системи не викликали специфічної загибелі курячих ембріонів, екстраембріональна рідина не мала гемаглютинуючої активності, тобто антигени є інактивованими, що відповідає вимогам ТУ У.

Після визначення безпечності всю увагу зосередили на визначенні гемаглютинуючої активності антигенів та специфічності компонентів тест-системи. Активність антигенів визначали в реакції гемаглютинації (РГА) з 1% суспензією еритроцитів півня. Для постановки реакції використовували фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) рН 7,2.

Для постановки РГА готували послідовні двократні розведення досліджуваних антигенів (Н1–Н14) від 1:2 до 1:4096. Після додавання 1 % суспензії еритроцитів півня планшет обережно струшували та залишали на 30 хвилин за кімнатної температури (20–25 °С). Облік реакції проводили з урахуванням контролів (контроль осідання еритроцитів, контроль негативного антигену) за наявності або відсутності гемаглютинуючої активності. За титр антигену приймали його найвище розведення, в якому була чітко виражена гемаглютинуюча активність. Результати випробувань наведені в таблиці 3.

Таблиця 3 – Результати визначення гемаглютинуючої активності антигенів

Найменування антигену	Інактивованій антиген	Титр в РГА
Антиген вірусу грипу підтипу Н1	А/свиня/Айова/15/30	1:256
Антиген вірусу грипу підтипу Н2	А/Сінгапур/1/57	1:128
Антиген вірусу грипу підтипу Н3	А/качка/Україна/63	1:512
Антиген вірусу грипу підтипу Н4	А/качка/Чехословачина/56	1:1024
Антиген вірусу грипу підтипу Н5	А/крячок/Півд. Африка/61	1:512
Антиген вірусу грипу підтипу Н6	А/індик/Масачусетс/65	1:256
Антиген вірусу грипу підтипу Н7	А/курка/Росія/87	1:2048
Антиген вірусу грипу підтипу Н8	А/індик/Онтаріо/67	1:128
Антиген вірусу грипу підтипу Н9	А/індик/Вісконсин/66	1:256
Антиген вірусу грипу підтипу Н10	А/курча/Німеччина/Н/49	1:1024
Антиген вірусу грипу підтипу Н11	А/качка/Англія/56	1:1024
Антиген вірусу грипу підтипу Н12	А/качка/Альберта/60/70	1:256
Антиген вірусу грипу підтипу Н13	А/мартин/Астрахань/1421/79	1:512
Антиген вірусу грипу підтипу Н14	А/мартин/Астрахань/227/84	1:512

З таблиці 3 видно, що активність всіх антигенів вірусу грипу «Тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипів Н1–Н14 в РЗГА» була не нижче 1:128, що відповідає вимогам ТУ У.

Визначення специфічності антигенів в РЗГА. Специфічність антигенів визначали в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) з використанням: референтних позитивних сироваток крові до вірусів грипу А підтипів Н1–Н14 та ньюкаслської хвороби (табл. 4).

Постановку реакції затримки гемаглютинації здійснювали відповідно до листівки-вкладки даного препарату. Робоча доза антигенів складала 4 ГАО, яку розраховували з урахуванням титру антигенів попередньо визначених в РГА. Облік реакції проводили з урахуванням контролів (контроль робочої дози, контроль еритроцитів, контроль на ізоаглютинацію). За титр антитіл приймали найвище розведення сироваток, що виявляло повну затримку гемаглютинації антигенів.

Результати досліджень по визначенню специфічної активності антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 наведені в таблиці 4.

З таблиці 4 видно, що антигени вірусу грипу, які входять до складу біопрепарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14», виробництва ННЦ «ІЕКВМ», специфічно реагують з гомологічними референтними сироватками в титрах від 1:32 до 1:1024. Антигени вірусу грипу підтипів Н1–Н14 не показували реакцію зі специфічною референтною сироваткою до вірусу ньюкаслської хвороби.

Визначення активності позитивних і негативної сироваток крові. Активність позитивних і негативної сироваток з тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 визначали в реакції затримки гемаглютинації з використанням антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 цього ж набору.

Крім того нами було проведено дослідження специфічних сироваток крові, що входять до складу тест-системи на відсутність спонтанної аглютинації з 1% суспензією еритроцитів півня. Для цього до сироваток в робочому розведенні було додано рівний об'єм суспензії еритроцитів. Облік реакції проводили через 30 хвилин. Встановлено, що всі сироватки крові після підготовки згідно з листівкою-вкладкою, які входять до складу набору, не викликали спонтанну аглютинацію еритроцитів півня.

Результати досліджень активності специфічних і негативної сироватки наведені в таблиці 5.

Із таблиці 5 видно, що всі позитивні сироватки крові з тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипів Н1–Н14 активні в РЗГА з гомологічними антигенами з цієї ж тест-системи. Титри позитивних сироваток знаходяться в межах від 1:32 до 1:256. Негативна сироватка крові з тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипів Н1–Н14 не мала антитіл до жодного з антигенів, що відповідає вимогам ТУ У.

Додатково, в якості негативного контрольного антигену була використана екстраембріональна рідина курячих ВПФ ембріонів 12-добової інкубації, виробництва фірми Ломан (Німеччина). За результатами постановки РЗГА позитивні та негативна сироватки не реагували з негативним антигеном.

Таблиця 4 – Визначення специфічної активності антигенів вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА з використанням референтних сироваток крові

Референтні сироватки крові	Антигени з Тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА (ННЦ «ІЕКВМ»)														Антиген ВНХ	
	Н1	Н2	Н3	Н4	Н5	Н6	Н7	Н8	Н9	Н10	Н11	Н12	Н13	Н14		
Н1	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н2	-	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н3	-	-	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н4	-	-	-	1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н5	-	-	-	-	1:64	1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н6	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н7	-	-	-	-	-	-	1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	
Н8	-	-	-	-	-	-	-	1:256	-	-	-	-	-	-	-	
Н9	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-	-	
Н10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-	
Н11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	
Н12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:32	-	-	-	
Н13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:512	-	-	
Н14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:256	-	
Референтна позитивна сироватка крові до ВНХ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:512

Примітка: «-» – негативна РЗГА позитивна РЗГА при титрі від 1:32 до 1:1024

Таблиця 5 – Результати визначення активності сироваток крові з тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу птиці А підтипів Н1-Н14

Позитивні сироватки крові з Тест-системи (ННЦ «ІЕКВМ»)	Антигени з Тест-системи для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1-Н14 в РЗГА (ННЦ «ІЕКВМ»)													
	Н1	Н2	Н3	Н4	Н5	Н6	Н7	Н8	Н9	Н10	Н11	Н12	Н13	Н14
Н1	1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Н2	-	1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Н3	-	-	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Н4	-	-	-	1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Н5	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Н6	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
Н7	-	-	-	-	-	-	1:512	-	-	-	-	-	-	-
Н8	-	-	-	-	-	-	-	1:256	-	-	-	-	-	-
Н9	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-	-
Н10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-	-	-
Н11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:64	-	-	-
Н12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-	-
Н13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:128	-
Н14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1:64
Негативна сироватка	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: «-» – негативна РЗГА позитивна РЗГА при титрі від 1:32 до 1:512

Також велика увага при проведенні комісійних випробувань була приділена апробації тест-системи «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА» з метою визначення її здатності виявляти антитіла до вірусу грипу в сироватках крові та жовтках яєць диких птахів. Для цього були використані польові сироватки крові та жовтки яєць диких птахів. Зразки сироваток і жовтків яєць надані ННЦ «ІЕКВМ» з архіву сироваток відділу вивчення хвороб птиці.

Результати постановки РЗГА зі зразками сироваток крові та жовтків яєць від диких птахів наведені в таблиці 6.

Таблиця 6 – Результати досліджень зразків сироваток крові та зразків жовтків яєць відібраних від диких птахів

Матеріал для досліджень	Титр антитіл до вірусу грипу
Сироватки крові гуски білолобої	Н10 – 1:128
Сироватка крові галагаза	Н4 – 1:64
Сироватка крові крижня	Н3 – 1:512
Сироватка крові голуба	Н13 – 1:256
Сироватка крові ластівки	Н2 – 1:64
Жовток яйця крижня	Н3 – 1:128
Жовток яйця огаря	Н11 – 1:128
Жовток яйця чоботоря	Н4 – 1:64
Жовток яйця коловодника болотного	Н10 – 1:128
Жовток яйця голуба	Н13 – 1:128

Таким чином при проведенні досліджень в сироватках крові та жовтках яєць нами були виявлені специфічні антитіла до вірусів грипу А різних підтипів (Н2, Н3, Н4, Н10, Н11, Н13) в титрах від 1:64 до 1:512. Це свідчить про те, що тест-система «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в РЗГА» дозволяє проводити серологічну діагностику та виявляти антитіла до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в сироватках крові та жовтках яєць одержаних як від сільськогосподарської птиці, так і від диких птахів.

Висновки. 1. За результатами проведених досліджень біопрепарату «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 у реакції затримки гемаглютинації», виробництва ННЦ «ІЕКВМ» (м. Харків), встановлено, що за показниками: зовнішній вигляд, наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів, герметичність закупорки, наявність вакууму, розчинність компонентів, стерильність, рН фосфатно-сольового буферу, повнота інактивації антигенів, активність та специфічність антигенів, активність та специфічність позитивних і негативної сироваток – досліджений препарат відповідає вимогам ТУ У.

2. За результатами апробації з польовими сироватками крові та жовтками яєць диких птахів встановлено, що «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в реакції затримки гемаглютинації» (виробництва ННЦ «ІЕКВМ») дозволяє проводити серологічну діагностику та виявляти антитіла до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в сироватках крові та жовтках яєць одержаних від диких птахів.

3. За результатами проведених комісійних випробувань вітчизняний біопрепарат «Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н1–Н14 в реакції затримки гемаглютинації» визнано високоактивним, специфічним, безпечним і на основі цього він рекомендований для впровадження в лабораторну практику ветеринарної медицини. Проводиться процедура завершення реєстрації його на території України.

Список літератури

1. Грип птиці. Епізоотологія, діагностика, профілактика [Текст] / Б.Т. Стегній [та ін.]; під ред. Б.Т. Стегнія. – Х. : NTMT, 2010. – С. 139–140. 2. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines [Electronic resource]. – Access mode : <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>. – Title from the screen.

THE COMMISSION PRODUCTION TESTING OF DOMESTIC TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO AVIAN INFLUENZA VIRUS A SUBTYPES H1-H14 IN THE HEMAGGLUTINATION REACTION DELAY

Stegniy B.T., Mayorova K.F., Muzyka D.V., Stegnyy M.Yu.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary medicine», Kharkiv

Ushkalov V.A., Babkin M.V., Blotskaya O.F.

The State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Dedok L.A.

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

The results of interdepartmental commission production testing of a biological product «Test system for the detection of antibodies to influenza A virus subtypes H1–H14 in the hemagglutination reaction delay» the development and production of NSC «IECVM». Were determined that this biological product is high, specific and safe.

УДК 57.043;578.71

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ ТА АТЕНУЙОВАНИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА

Стегній М.Ю.

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

Хвороба Марека (ХМ) – це висококонтагіозне захворювання курей та індичок з двома формами перебігу: перша – класична, характеризується поразкою периферичної й центральної нервової системи; друга – гостра, характеризується лейкозом і утворенням лімфоїдних пухлин.

До застосування вакцинопрофілактики ХМ наносила величезний економічний збиток у всіх країнах світу з розвиненим птахівництвом. Вірусна природа хвороби була доведена в 1967 році. Збудник ХМ – вірус хвороби Марека (ВХМ) належить до сімейства α -герпесвірусів [1, 2, 4].

Він має три серотипи. До першого серотипу відносяться віруси, здатні викликати лімфоми у птахів; а також атенувані його варіанти. Природно ослаблені неонкогенні віруси ХМ другого серотипу володіють протективними властивостями, тому використовуються як посилюючі імунну відповідь компоненти в бівалентних вакцинах.

Третій серотип ВХМ представлений антигенно спорідненими не онкогенними вірусами герпесу індичок (ВГІ). Вірусні частки мають діаметр 85–100 нм, але зустрічаються й більші віріони з оболонкою, розміром 150–170 нм, які можуть містити або не містити електронно-щільний нуклеоїд.

Віріони розташовуються здебільшого в ядрі клітин. У препаратах епітелію пір'яних фолікул присутні великі безструктурні частки розміром 275–400 нм у діаметрі [1].

Вірус має складну антигенну структуру, яка представлена шістьма антигенами. Найбільш важливі з них А, В, С-антигени. А-антиген містить всі патогенні штами. Атенуація вірусу пов'язана із втратою цього антигену. А-антиген загальний для всіх штамів вірусу хвороби Марека. Між штамми, виділеними від індичок і курчат, відзначена відмінність по декількох другорядних антигенах.

Гемаглютинуючі властивості вірусу не встановлені. Штами відрізняються за характером ЦПД, за активністю репродукції в культурі клітин і морфологією бляшок, кількістю позаклітинного вірусу.

При вивченні антигенної структури вірусу необхідно враховувати ту обставину, що штамми не повинні пасажуватися більше за 10 пасажів, оскільки в цьому випадку зникає А-антиген. За А-антигеном віруси герпесу індичок є родинними, але не ідентичними.

Репродукція вірусу починається в ядрі ураженої клітини, потім вірус здобуває білкову оболонку при переході в цитоплазму, де розмір віріонів збільшується. Морфогенез вірусу в клітинах сприйнятливих птахів може бути завершеним і незавершеним. Чутливими до вірусу біологічними системами є курчата, курячі ембріони, культури клітин органів курячих ембріонів. У пухлинних клітинах інфікованого птаха вірус може бути інтегрований із клітинним геномом, у клітинах бурси Фабріціуса – у вигляді неповного вірусу, представленого специфічним антигеном, а в клітинах пір'яних фолікулів – у вигляді віріонів із зовнішньою оболонкою, патогенного та стійкого до впливів зовнішнього середовища.

Було встановлено, що вірус може бути в клітині у двох формах: клітинно-асоційованій та вільній від інтеграції з будь-якими клітинними структурами.

Через 5–7 діб після інфікування з'являються округлі клітини різної форми. Потім утворюються рефрактивні клітини й часто багатоядерні гігантські клітини з еозинофільною гранулярною цитоплазмою й внутрішньоядерними включеннями типу А.

Мета роботи. Визначити оптимальні технології кріоконсервування та зберігання виробничих штамів та атенуованих ізолятів вірусу хвороби Марека.

Матеріали та методи. Для напрацювання біомаси ВХМ використовували первинно – трипсинізовану клітинну культуру фібробластів ембріонів курей (ФЕК), отриману з 10–11-добових курячих ембріонів. Культивування клітин здійснювали за стандартною методикою [5, 7] у суміші рівних обсягів середовища 199 та Ігла з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ). Зараження клітинного моношару проводили за стандартною вірусологічною методикою [5]. Культивування інфікованих вірусом клітин здійснювали у підтримуючому середовищі того ж складу, але з 2 % сироваткою (ВРХ). У роботі використовували виробничий штам SBG (*Gallid herpesvirus type 2*) вірусу другого серотипу, атенуований штам NR8/08 першого серотипу, атенуовані ізоляти 3/11; 5/11ВХМ першого серотипу (*Gallid herpesvirus type 1*) хвороби Марека. Усі перелічені віруси з колекції лабораторії біотехнології ННЦ «ІЕКВМ». Збереженість системи вірус-клітина контролювали за методом суправітального фарбування трипановим синім у камері Горяєва [10]. Для підвищення схоронності та життєздатності кріоконсервованих клітин застосовували кріопротектор діметилсульфоксид у кінцевих концентраціях від 2 до 10 %. Кріоконсервування інфікованих клітин здійснювали у кріопробірках фірми Nunk об'ємом 4,5 см³ на програмному заморожувачі виробництва СКТБ і ОП ІПК і К НАН України. Інфекційну активність ВХМ визначали титруванням на первинній культурі клітин фібробластів ембріонів курей (ФЕК), у культуральних флаконах ємністю 50 см³. При цьому зараження проводили в об'ємі 0,5 см³ кожним десятикратним розведенням вірусу на 4–5 флаконів моношару клітин за стандартною методикою [5]. Після цього інфікова-