

ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННОЇ СПОРІДНЕНОСТІ ШТАМУ «ПЕТРІКІВСЬКИЙ–2006» ВІРУСУ ХВОРОБИ АУЕСКІ З ВИРОБНИЧИМИ ШТАМАМИ

М. П. Ситюк¹, О. О. Напненко²

¹Інститут ветеринарної медицини НААН

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

У статті наведені результати досліджень антигенної спорідненості штаму «Петріківський–2006» з деякими виробничими штамми вірусу хвороби Ауескі («Арський», «18в», маркованої вакцини «Бегонія»), що зберігаються в депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Вивчення антигенної спорідненості штамів вірусу хвороби Ауескі проводили з використанням односторонньої реакції нейтралізації з постійною дозою специфічної сироватки на перещеплюваній культурі клітин ВНК-21. За результатами досліджень визначені індекси нейтралізації та зроблено висновок про те, що штам «Петріківський–2006» споріднений з іншими штамми вірусу хвороби Ауескі.

Ключові слова: ВІРУС ХВОРОБИ АУЕСКІ, ШТАМИ, КУЛЬТУРА КЛІТИН, РЕАКЦІЯ НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ, ІНДЕКС НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ, АНТИГЕННА СПОРІДНЕНІСТЬ

Хвороба Ауескі (ХА) вже 110 років відома людству як контагіозне вірусне захворювання усіх видів домашніх тварин, диких та хутрових звірів [1]. В антигенному відношенні збудник ХА однорідний [2]. На сьогодні існують та певним чином вивчені такі штами вірусу ХА: вірулентні — П, Арський [3]; атенуйовані - БУК-622, БУК-900, ВГНКИ, МК-25, МК 49 [4–6]; марковані — ВК, Bartha K-61 [7, 8]. Одним із важливих завдань в системі комплексного вивчення хвороби Ауескі є визначення біологічних властивостей ізолятів збудника по морфологічним, культуральним та молекулярно-генетичним характеристикам. Не дивлячись на сучасний підхід у вивченні збудника хвороби Ауескі з використанням молекулярно-генетичних методів, серологічна ідентифікація останнього, з використанням реакції нейтралізації «in vivo» або «in vitro», є головним тестом по ідентифікації виділених ізолятів та визначенню їх властивостей [2]. В доповнення цього слід навести приклад відносно рекомендацій МЕБ по використанню в діагностичних цілях двох методів — реакції нейтралізації та ІФА [9]. Поєднання серологічних та молекулярно-генетичних методів дозволяють об'єктивно визначати біологічні характеристики збудника ХА його варіабельність та спорідненість..

Метою наших досліджень було визначити антигенну спорідненість нового штаму вірусу ХА — «Петріківський–2006», що було виділено від домашніх свиней Ситюком М. П. та задепонованого в депозитарії ДНКІБШМ з виробничими штамми вірусу хвороби Ауескі — «Арський», «18 в»; маркованого вакцинного — «Бегонія».

Матеріали і методи

Штами вірусу хвороби Ауескі, котрі зберігаються у колекції ДНКІБШМ: «Арський» — вірусутримуюча культуральна рідина, пасаж 27/11 від 24.07.2011р., титр 6,8 lg ТЦД₅₀/см³; «18 в» — ліофільновисушений УНДіЕВ від 28.07.2001, титр 7,5 lg ТЦД₅₀/см³; «Петріківський–2006» вірусутримуюча культуральна рідина 8-го пасажу від 22.07.2011, титр 5,5 lg ТЦД₅₀/см³; маркована вакцина «Бегонія» виробництва Інтервет Інтернешнл ліофільновисушена вірусна сировина, що містить вірус у кількості 5,5 lg ТЦД₅₀/см³ в одній дозі. Гіперімумна (позитивна) сироватка крові кіз, з титром специфічних нейтралізуючих

антитіл проти вірусу хвороби Ауескі штам «Петріківський–2006» — 1:128. Контрольна (негативна) сироватка крові кози.

Кожним з цих штамів було проведено 4 послідовних пасажі в культурі клітин ВНК-21 та визначено інфекційну активність, котра на 4-му пасажі становила: для штаму «Арський» — 8,2; «18в» — 7,7; «Петріківський–2006» — 7,7; вакцина «Бегонія» — 5,45 lg ТЦД₅₀/см³.

При дослідженні використовували сучасну апаратуру — ламінарний бокс та СО₂ інкубатор фірми JOUAN, інвертований мікроскоп фірми ZEISS AXIOVERT 25, пластикові мікропланшети з плоским та U-подібним дном фірми Sarstedt, inc. Newton, NC 28658 Made in USA, скляні матраци об'ємом 50 см³, автопіпетку восьмиканальну та одно каналну фірми BIONIT 50–250 мкл; ростові середовища: ДМЕМ, 199, розчин версену 0,02 % для культур клітин, сироватку крові ВРХ без консерванту нативну, розчин трипсину 0,25 % на фосфатному буфері для культур клітин виробництва ТОВ НВП «Біо-Тест-Лабораторія».

Постановку реакції нейтралізації з різними розведеннями вірусу та постійною дозою сироватки крові проводили згідно з методикою [10]. В якості біологічної моделі використовували перещеплювану культури клітин ВНК-21.

Результати й обговорення

Штами вірусу хвороби Ауескі для випробування були взяті з депозитарію ДНКІБШМ, для дослідження штаму «Бегонія» взяли комерційну серію вакцини. Попередньо штами вірусу ХА нами були протитровані та визначено їх інфекційну активність.

У планшеті з круглим дном готували 10-кратні розведення кожного штаму вірусу в чотирьох повторях при умові, що останнє розведення перевищувало біологічний титр вірусів. Специфічну (позитивну) сироватку крові до штаму «Петріківський–2006», з титром антитіл 1:128 розводили в дозі 5 НД₅₀/см³ та додавали в кожную лунку з розведеннями вірусу за умови, що об'єм сироватки і вірусу був однаковим (1:1). В досліді ставили: а) контроль культури клітин — у 4 лунки вносили тільки живильне середовище, для виявлення неспецифічної дегенерації клітин моношару; б) контроль токсичності сироватки — у 4 лунки вносили сироватку в найменшому розведенні, яке використовували в реакції + рівний об'єм підтримуючого середовища; в) позитивний контроль сироватки; г) негативний контроль сироватки.

Вмістиме планшета змішували коловими рухами, витримували 1 годину (контакт вірусу з антитілами) в СО₂ інкубаторі. Після контакту суміші переносили на попередньо вирощений моношар клітин планшета з плоским дном, та ставили в СО₂ інкубатор. Облік результатів проводили на 5-ту добу.

Число, яке показує у скільки разів специфічна сироватка знижує титр вірусу порівняно з контрольною, називається індексом нейтралізації (ІН). ІН розраховується шляхом відношення титру вірусу в присутності контрольної сироватки до титру вірусу із специфічною сироваткою. Тири вірусів розраховували статистично за таблицею Ріда і Менча. Результати проведених досліджень наведені в таблиці.

Показники даної таблиці вказують на те, що індекси нейтралізації для штамів «Петріківський–2006», «Арський», «18в», «Бегонія» становили 3,26; 2,9; 2,66; 2,5 відповідно. За даним прикладом можна зробити висновок про те, що позитивна сироватка крові нейтралізувала 10^{3,26} доз вірусу штаму «Петріківський–2006»; 10^{2,9} — штаму «Арський»; 10^{2,66} — штаму «18в» та 10^{2,5} — доз маркованого штаму вакцини «Бегонія», знизивши їх інфекційні титри. Крім індексу нейтралізації нами був розрахований коефіцієнт r за формулою:

$$r = \frac{\text{індекс нейтралізації вірусу № 2 специфічною сироваткою до вірусу № 1}}{\text{індекс нейтралізації вірусу № 1 специфічною сироваткою до вірусу № 1}}$$

Визначення індексів нейтралізації виробничих штамів вірусу хвороби Ауескі в культурі клітин ВНК-21

Розведення вірусів	Сироватка специфічна до штаму «Петріківський-2006»				Негативна сироватка			
	Петріківський-2006	Арський	18в	Бегонія	Петріківський-2006	Арський	18в	Бегонія
10^{-1}	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10^{-2}	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
10^{-3}	++++	++++	++++	++--	++++	++++	++++	++++
10^{-4}	++++	++++	++++	----	++++	++++	++++	++++
10^{-5}	----	++--	++--	----	++++	++++	++++	++--
10^{-6}	----	----	----	----	++++	++++	++++	----
10^{-7}	----	----	----	----	++--	++--	++++	----
10^{-8}	----	----	----	----	++--	++--	++--	----
10^{-9}	----	----	----	----	----	++--	----	----
10^{-10}	----	----	----	----	----	----	----	----
Титр, lg ТДЦ ₅₀ /см ³	4,5	5,33	5,0	3,0	7,76	8,23	7,66	5,5
ІН	3,26	2,9	2,66	2,5	—	—	—	—
г	—	0,88	0,81	0,76	—	—	—	—

Примітка: «+» — прояв цитопатичної дії вірусу ХА в моношарі клітин лунки пластикового планшета; «-» — відсутність цитопатичної дії вірусу ХА; г — показник відношення індексів нейтралізації між досліджуваними штамми

Цей показник підтверджує антигенну спорідненість або відмінність між досліджуваними штамми. Слід зазначити, чим наближеніші показники г до 1, тим менше відмінностей між досліджуваними штамми. При г = 1 різниця відсутня. Розрахунок показників г вказує на певну антигенну спорідненість, котра між штамми «Петріківський-2006» та «Арський» становить 0,88; між штамми «Петріківський-2006» та «18в» — 0,81; між штамми «Петріківський-2006» та «Бегонія» — 0,76.

Висновки

При визначенні антигенних властивостей депонованих штамів вірусу хвороби Ауескі з постановкою односторонньої реакції нейтралізації встановлено показники г, котрі попередньо характеризують спорідненість штаму «Петріківський-2006» зі штамми «Арський», «18в» та «Бегонія» на рівні 0,88; 0,81; 0,76.

Перспективи подальших досліджень. Використання штаму «Петріківський-2006» у вірусологічних та серологічних тестах, зокрема реакції нейтралізації, з метою діагностики захворювання та визначення антигенних властивостей штамів вірусу хвороби Ауескі.

N. P. Sytyuk, A. A. Napnenko

STUDYING ON THE ANTIGENIC RELATIONSHIP OF «PETRIKOVSKIY-2006» STRAIN TO THE INDUSTRIAL STRAINS OF AUJESZKY'S DISEASE

S u m m a r y

In the article it is shown the results of the studying on the antigenic relationship of «Petrikovskiy-2006» strain to some industrial strains of Aujeszky's disease («Arskiy», «18v», marked vaccine «Begoniya» which are stored in the depositories of the State Scientific and Control Institute of Biotechnology and microorganisms' strains (SSCIBMS). Studying on the antigenic relationship strains of Aujeszky's disease was provided by using one-way neutralization test with the stable dose of the specific serum on the cell culture BHK-21. According to the results the neutralization indexes were determined and it was concluded that «Petrikovskiy-2006» strain is related to the other strains of Aujeszky's disease.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОГО РОДСТВА ШТАММА «ПЕТРИКОВСКИЙ–2006» ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ С ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ ШТАММАМИ

А н н о т а ц и я

В статье приведены результаты исследований антигенного родства штамма «Петриковский–2006» с некоторыми производственными штаммами вируса болезни Ауески («Арский», «18в», маркированной вакцины «Бегония»), которые хранятся в депозитарии Государственного научно-контрольного института биотехнологий и штаммов микроорганизмов (ГНКИБШМ). Изучение антигенного родства штаммов вируса болезни Ауески проводили с использованием односторонней реакции нейтрализации с постоянной дозой специфической сыворотки на перевиваемой культуре клеток ВНК-21. По результатам исследований определены индексы нейтрализации и сделан вывод о том, что штамм «Петриковский–2006» родственен с другими штаммами вируса болезни Ауески.

1. Коломыцев А. А. Болезнь Ауески — эпизоотическая ситуация и современная система мер борьбы : труды Междунар. науч.-практич. конф. «Болезни диких животных» 28–30 сент. 2004 г / А. А. Коломыцев, А. А. Стрижаков, Д. Г. Федоров, В. А. Филоматова. — Покров, 2004. — С. 134–145.

2. Сюрин В. Н. Болезнь Ауески / В. Н. Сюрин, А. Я. Самуйленко, Б. В. Соловьев, Н. В. Фомина // Вирусные болезни животных. — М. : ВНИТИБП, 1998. — С. 603–630.

3. Юсупов Р. Х. Адаптация вируса болезни Ауески на новой культуре клеток / Р. Х. Юсупов, В. С. Угрюмова, Г. Ф. Ильясова и др. // Ветеринария. — 2003. — № 11. — С. 22–25.

4. Жестерев В. И. Оценка некоторых биологических свойств вируса болезни Ауески : материалы науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней — неотложные проблемы науки и практики» «Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии», 9–11 нояб. 1994 г / В. И. Жестерев, В. А. Мищанин, Р. В. Кошелева и др. — Покров, 1995. — С. 131–132.

5. Федоров Д. Г. Вклад ВНИИВВиМ в разработку методов диагностики и вирусспецифической профилактики болезни Ауески : материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфелда-Якоба и другие прионные болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена» 30–31 мая 2001 г. / Д. Г. Федоров, В. И. Жестерев, Е. М. Хрипунов и др. — Покров, 2001. — С. 152–154.

6. Хрипунов Е. М. Разработка вакцины против болезни Ауески для орального применения : материалы науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ «Классическая чума свиней — неотложные проблемы науки и практики» «Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии», 9–11 нояб. 1994 г / Е. М. Хрипунов, В. И. Жестерев, В. А. Мищанин и др. — Покров, 1995. — С. 130–131.

7. Ясенева Е. А. Динамика накопления полноценного вируса болезни Ауески маркированного штамма «ВК» в перевиваемой линии клеток ВНК-21 / Е. А. Ясенева // Ветеринар. патология. — 2006. — № 4. — С. 107–108.

8. Schlesinger K. J. Intranasal administration of Pseudorabies (Bartha K.61) vaccine in neonates and grow/finish pigs: safety and efficacy of vaccination and effects of virulent challenge exposure / K. J. Schlesinger, J. M. Williams, P. W. Widel. — I.P.V.S. Congress, Lausanne 1990. — P. 260

9. Прискока В. А. Методические рекомендации по определению антигенного родства, различий и доминантности вирусов в серологических реакциях / В. А. Прискока, А. И. Собко, К. В. Манзий. — К., 1987. — 20 с.

10. МИБ. Кодекс здоровья наземных животных : 19-е изд. Общие положения / МИБ. — Т. 1. — 2010. — 471 с.

Рецензент: зав. лабораторії хвороб коней IBM НААН, д. вет. наук Синицин В. А.