



ISSN 0002-3221

КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН УЛУТТУК
ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫНЫН

КАБАРЛАРЫ

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

2017

№2



*Фонд Верна
диссертация
№ 03.17.558
Габирова Т.С.*

КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНЫН
УЛУТТУК ИЛИМДЕР АКАДЕМИЯСЫНЫН

КАБАРЛАРЫ

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

БИШКЕК



2017

ilim.izdatelstvo@gmail.com

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Шаршеналиев Ж., Бакасова А.Б.** Проблемы нелинейной динамики самоорганизующихся систем с векторным управлением.....7
 Өзүн-өзү уюштуруучу татаал динамикалуу тутумдарды вектордук башкаруудагы көйгөйлөр
 Nonlinear Dynamics Problems of Self-Organizing Systems With Vector Control
- Гадов С.М.** Применение интегральных схем для контроля воздействия различных внешних факторов.....20
 Ар кыл сырткы факторлордун таасирин көзөмөлдөөдө интегралдык схемаларды колдонуу
 Application of integrated schemas for control of influence of various external factors

ГЕОЛОГИЯ

- Ниязбек уулу Ч., Чень И., Що В., Сакиев К., Санг М., Орозбаев Р.** Литологическая характеристика и возраст пород в районе Вуласитай, западная Джунгария, Китай.....23
 Вуласитай аймагында (батыш Жунгар, Кытай) жайгашкан тоо-тектердин литологиялык мүнөздөмөсү жана жашы
 Lithological characteristics and ages of rocks in Wulasitai area, West Junggar, China

БИОЛОГИЯ

- Усупбаев А. К.** Новый вид и ключ для определения видов рода *TRisetum* PERS. (POACEAE) в Кыргызстане.....31
 Кыргызстандын *TRisetum* PERS. (POACEAE) тукумунун түрлөрүн аныктоочу ачкыч жана жаңы түр
 The New Species and Identification Key for Species of the genus *TRisetum* PERS. (POACEAE) in Kyrgyzstan
- Жугунисов К. Д., Жунушов А.Т.** Совершенствование режима инактивации вируса блутанга бета-пропиолактоном.....35
 Блутанг вирусунун бета-пропиолактон менен инактивтендирүү режимин жакшыртуу
 Improving the beta-propiolactone inactivation mode of the bluetongue virus
- Касымбекова Э.Ш., Мосолова С.Н.** Поясное распределение паразитных микромицетов лекарственных растений Киргизского хребта и Чуйской долины.....41
 Кыргыз кырка тоолорунун жана Чүй өрөөнүнүн дары-дармек өсүмдүктөрүнүн мите микромицеттерин алкактар боюнча таралышы
 Half-length distribution of parasitic micromycetes of medicinal plants of the Kyrgyz backbone and Chuy Valley
- Темиркул кызы Каухар** Влияние климатических факторов на жизнедеятельность *PROFENUSA PYGMAEA* (KLUG, 1818) в условиях г. Бишкека.....45
 Бишкек шаарынын шартында *PROFENUSA PYGMAEA* (KLUG, 1818) нин жашоо тиричилигине климаттык факторлордун тийгизген таасири
 Influence of Climatic Factors on the Life *PROFENUSA PYGMAEA* (KLUG, 1818) in the Conditions Bishkek
- Калыкова Г.Н., Сагитов А.О.** Базидиальные грибы пихтовых лесов Западного Тянь-Шаня.....51
 Батыш Тянь-Шандагы ак карагай токойлорундагы базидиялуу козу карындар
 Basidial fungi of *Abies semenovii* forest of the Western Tian-Shan

УДК: 578.57.083.2

Совершенствование режима инаktivации вируса блутанга бета-пропиолактоном

Жугунисов К.Д. - аспирант института Биотехнологии НАН КР
Жунушов А.Т. - профессор, д.в.н., член-корр. НАН КР, Директор института биотехнологии НАН КР

В данной статье представлены результаты работы по совершенствованию режима инаktivации вируса блутанга с использованием бета-пропиолактона в различных концентрациях.

Ключевые слова: Блутанг, вирус, инаktivация, бета-пропиолактон

Блутанг вирусунун бета-пропиолактон менен инаktivтендируу режимин жакшыртуу

Бул макалада блутанг оорусуна каршы инаktivтелген вакцина даярдоо үчүн блутанг вирусун бета-пропиолактондун ар турдүү концентрациясы менен инаktivтендируу режимин жакшыртуу боюнча жасалган жумуштардын натыйжалары көрсөтүлгөн.

Негизги сөздөр: Блутанг, вирус, инаktivтендируу, бета-пропиолактон

Improving the beta-propiolactone inactivation mode of the bluetongue virus

This article presents the results of work to improve the mode of inactivation of the bluetongue virus with beta-propiolactone in various concentrations.

Keywords: Bluetongue, virus, inactivation, beta-propiolactone

Введение

Одним из наиболее важных и сложных вопросов в системе противозооотических мероприятий при блутанге является вакцинация. Для профилактики блутанга в мире разработаны моно [1, 2], поливалентные живые [3] и инаktivированные вакцины [4-7]. Инаktivированные вакцины для профилактики блутанга широко применяют на практике в силу их ряда преимуществ перед живыми препаратами.

Важным условием эффективности инаktivированных вакцин является количество и качество вирусного антигена, выбор инаktivанта и оптимальных условий инаktivаций, позволяющих полностью лишить вирус инфекционности при максимальном сохранении антигенной активности [8].

На процесс инаktivации влияют следующие факторы: концентрация инаktivанта, продолжительность воздействия, pH и температу-

ра реакционной среды. Следует отметить, что инаktivация должна быть не только эффективной, но и максимально щадящей. Иными словами, сопутствующие изменения в структуре вирусных частиц и их компонентов должны быть минимальными. Однако механизм инаktivированных воздействий во многих отношениях недостаточно выяснен, и их использование зачастую носит эмпирический характер. Необходимо выбрать оптимальные «щадящие» условия инаktivации, при которых не снижается исходная антигенная активность возбудителя, а инфекционная активность полностью утрачивается [8].

В производстве инаktivированных вакцин, в том числе против блутанга, наиболее широко применяются формальдегид, димерэтиленмин (ДЭИ) и бета-пропиолактон (БПЛ). В сравнительном аспекте, по результатам ранее проведенных исследований среди указанных

химических веществ, более щадящим инактивантом для вируса блутанга являлся БПЛ [9]. Однако, исследование ограничивалось всего лишь выбором инактиванта и определением отдельных параметров инаktivации. Важным условием получения качественного вирусного антигена, является выбор инактиванта и определение оптимальных условий инаktivации, позволяющих полностью лишить вирус инфекционной активности при максимальном сохранении антигенности.

Цель нашей работы усовершенствование режима инаktivации БПЛ вируса блутанга, изучение влияния концентрации инактиванта, pH реакционной среды, температуры, продолжительности процесса инаktivации, и влияние данных параметров на антигенные свойства вируса.

Матриалы и методы

Проведение эксперимента

В эксперименте использовали вирусосодержащую суспензию (ВСС) штамма «RT-RIBSP 07/16» вируса блутанга, наработанную в культуре клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21) с инфекционной активностью $6,75 \pm 0,12 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и антигенной активностью 1:64. В качестве инактиванта использовали бета-пропиолактон (БПЛ) очищенный 98%. Для инаktivации вируса готовили 8% рабочий водный раствор.

Для инаktivации вируса блутанга в ВСС добавляли раствор БПЛ в конечных концентрациях 0,05%, 0,1% и 0,2%. Инаktivацию вируса проводили при температурах 4, 22 и 37°C.

Величину pH среды устанавливали в диапазонах 6,5-6,9; 7,0-7,4 и 7,5-8,0. Проверку процесса инаktivации проводили отбором образцов проб через каждые 1 ч в течение всего периода инаktivации для определения снижения инфекционной активности вируса и оценки сохранности антигена. Остаточное содержание БПЛ в пробах нейтрализовали путем добавления 25%-го рабочего раствора тиосульфата натрия в конечной концентрации 0,25%.

Инфекционная активность вируса определялась по общепринятой методике с учётом результатов титрования по методу L. Reed и H. Muench и выражением в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Оценку сохранности антигенной активности вируса блутанга проводили методом твердофазного иммуоферментного анализа (ТФ-ИФА).

Полноту инаktivации вируса проверяли в культуре клеток ВНК-21 путём трёхкратного пассирования и интрацеребральным заражением мышат-сосунов 3-5 сут возраста. Авирулентными считали инаktivированные суспензии, из которых вирус не проявлял цитопатическое действие при пассировании в культуре клеток, и не вызывал гибели мышат.

Результаты исследований

Инаktivация БПЛ вируса блутанга в конечных концентрациях 0,05, 0,1 и 0,2% при разных температурных режимах

При инаktivации БПЛ применяли разные температурные режимы. Результаты исследований оценивали по кривым инаktivации, представленным на рис. 1, 2 и 3.

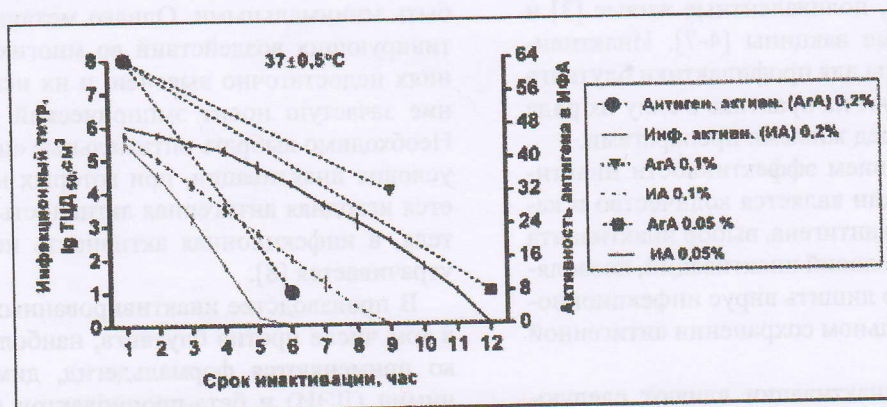


Рис. 1. Кинетика инаktivации БПЛ штамма «RT-RIBSP 07/16» вируса блутанга при температуре (37±0,5) °C

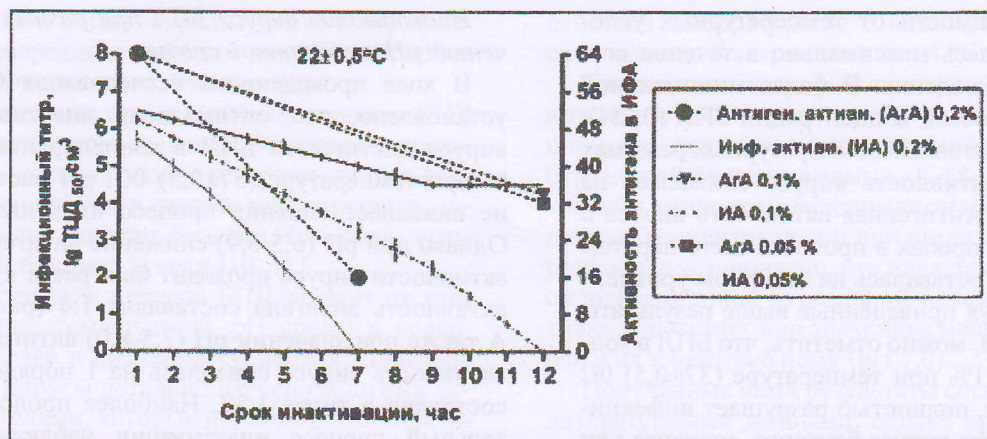


Рис. 2. Кинетика инактивации БПЛ штамма «RT-RIBSP 07/16» вируса блутанга при температуре ($22 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$

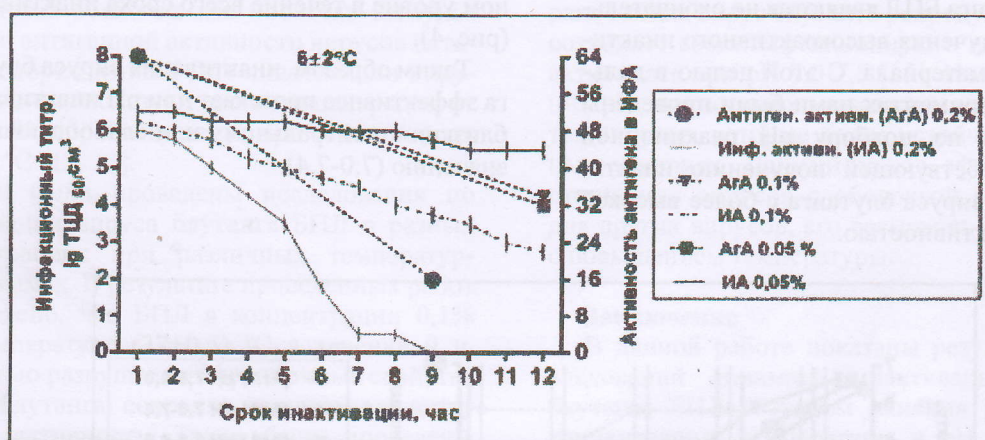


Рис. 3. Кинетика инактивации штамма «RT RIBSP07/16» вируса блутанга БПЛ при температуре (6 ± 2) $^\circ\text{C}$

Из данных рис. 1, 2 и 3 видно, что полная потеря инфекционной активности вируса при инактивации БПЛ в конечной концентрации 0,2 % и температурах (6 ± 2) $^\circ\text{C}$, ($22 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$ и ($37 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$ наступает на 9, 7, и 6 ч., соответственно. При концентрации инактиванта 0,1% вирус теряет инфекционную активность через 9 ч., снижение концентрации БПЛ до 0,05 % и температура ($37 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$ увеличивают время, необходимое для инактивации вируса до 12 ч. (рис. 1).

На рис. 2 в виде кривой линии изображена скорость инактивации вируса блутанга БПЛ при температуре ($22 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$. Как видно из рисунка, при воздействии 0,1 % концентрации инактиванта в течение 12 ч. происходит полная инактивация инфекционной активности вируса блутанга, а при 0,05 % концентрации БПЛ за 12 ч. инфекционная активность вируса снижалась на $1,50 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Опыты показали,

что обработка вируса БПЛ в указанной концентрации не приводит к дальнейшему снижению его инфекционной активности.

На рис. 3 графически изображена динамика инактивации блутанга БПЛ при температуре (6 ± 2) $^\circ\text{C}$. Как видно из рисунка, при концентрациях 0,05 % и 0,1 % активность вируса за 12 ч снижается на $1,50 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ и $3,0 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$, соответственно. Увеличение продолжительности обработки вируса БПЛ в указанных концентрациях не приводит к дальнейшему снижению его активности.

Инфекционная активность вируса в контроле (без инактиванта) в течение 12 ч. инкубирования при температуре ($37 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$ снизилась на $0,25 \pm 0,01 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$, при температурах (6 ± 2) $^\circ\text{C}$ и ($24 \pm 0,5$) $^\circ\text{C}$ титр вируса оставался на исходных уровнях.

Антигенная активность вируса при инактивации БПЛ в конечной концентрации 0,1

% вне зависимости от температурных условий сохранилась максимально в течение всего срока наблюдения. В более минимальной (0,05%) и высокой концентрации БПЛ (0,2%), при всех испытанных температурных режимах антигенная активность вируса снижалась на 2-3 порядка. Антигенная активность вируса в контрольных пробах в процессе всего периода инактивации оставалась на исходном уровне.

Анализируя приведённые выше результаты исследований, можно отметить, что БПЛ в концентрации 0,1% при температуре $(37 \pm 0,5)$ °C в течение 9 ч. полностью разрушает инфекционные свойства вируса блутанга, сохраняя при этом его антигенную активность. Отработанные вышеизложенные параметры инактивации вируса блутанга БПЛ являются не окончательными для получения высокоактивного инактивированного материала. С этой целью в дальнейших экспериментах нами были проведены исследования по подбору pH реакционной среды, способствующей получению инактивированного вируса блутанга с более высокой антигенной активностью.

Инактивация вируса БПЛ при разных значениях pH реакционной среды

В ходе проведенного исследования было установлено, что оптимальная инактивация вируса достигается БПЛ в концентрации 0,1% при температуре $(37 \pm 0,5)$ °C, pH раствора не оказывает влияния процесс инактивации. Однако при pH (6,5-6,9) снижение антигенной активности вируса проходит быстрее и к 12 ч активность антигена составляла 1:4 (рис. 4). А также при значении pH (7,5-8,0) антигенная активность вируса снизилась на 1 порядок, и составлял в титре 1:32. Наиболее продолжительный процесс инактивации наблюдается при значении pH (7,0-7,4). При этом антигенная активность вируса оставалась на исходном уровне в течение всего срока инактивации (рис. 4).

Таким образом, инактивация вируса блутанга эффективнее протекает при pH инактиванта, близких к нейтральному или слабощелочному значению (7,0-7,4).

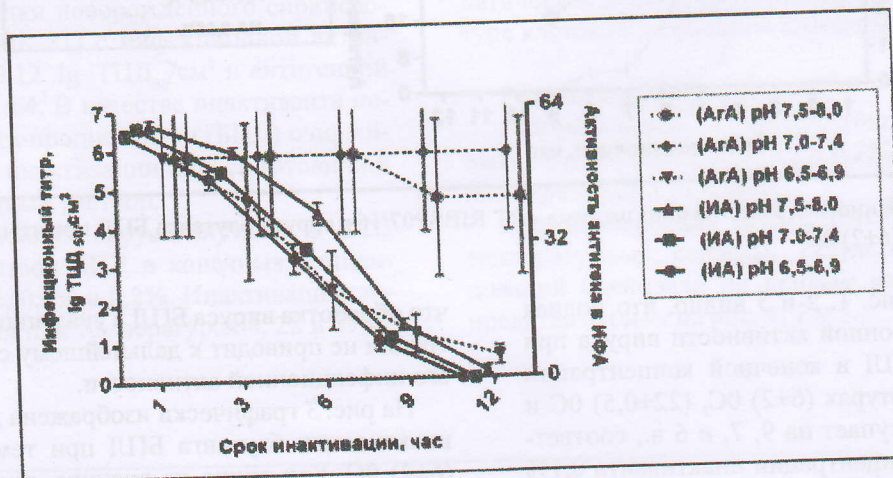


Рис. 4. Кинетика инактивации вируса блутанга БПЛ в концентрации 0,1% при разных значениях pH реакционной среды

Проверка полноты инактивации вируса блутанга

Для изучения полноты инактивации применяли метод обнаружения вируса из инактивированных 0,1% препаратом в культуре клеток в течение 3 последовательных пассажей. В результате установлено, что каких-либо деструктивных изменений в монослое клеток не обнаружено. Далее определяли авирулентность инактивированных материалов на 3-5 дневных мышатах-сосунах. В результате проведенных экспериментов все зараженные мышата — со-

суны остались живыми, без проявления каких-либо клинических признаков болезни в течение 7 сут (срок наблюдения). Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные пробы являются авирулентными.

Обсуждение

Одним из проверенных и достаточно надежных химических агентов используемых для инактивации вирусов является БПЛ. Данный инактиватор представляет собой высокоактивный алкилирующий агент, нестойкий в водных

растворах и легко гидрализуемый с образованием безвредных веществ: гидроакриловой и бета-оксипропионовой кислот [8].

В настоящее время с использованием БПЛ изготовлены авирулентные, безвредные вакцины и диагностические препараты против клещевого энцефалита, ящура, полиомиелита, энцефаломиелита птиц, болезни Ньюкасла, чумы свиней и болезни Ауески [10, 11].

Инактивация вирусов БПЛ зависит от концентрации, температуры, рН среды и содержания белка в вирусной суспензии. Действие БПЛ на вирусы детально изучено многими исследователями, которые полагают, что инактивирующий эффект этого реагента обусловлен реакцией с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот. При этом протеиновая оболочка как носитель иммуногенной и антигенной активности вирусов остается неповрежденной. Для инактивации вирусов обычно используют его в концентрации от 0,1 до 1 %, обработку ведут при температурах (4 – 37) °С [12, 13].

Нами были проведены исследования по инактивации вируса блутанга БПЛ в разных концентрациях при различных температурных режимах. В результате проведенных работ установлено, что БПЛ в концентрации 0,1% при температуре (37±0,5) °С в течение 9 ч. полностью разрушает инфекционные свойства вируса блутанга, сохраняя при этом его антигенную активность. Также были проведены исследования по влиянию рН среды на инфекционную и антигенную активности вируса при инактивации. В ходе проведенного исследования было установлено, что инактивация вируса в суспензиях достигается в концентрации 0,1% БПЛ при температуре (37±0,5) °С при испытанных значениях рН. Однако, наилучшие результаты были получены при значении рН (7,0–7,4). При этом полностью разрушены инфекционная активность вируса блутанга, тогда как антигенная активность вируса оставалась на исходном уровне в течение всего срока инактивации.

Аналогичные исследования были проведены Т.Хлыбовой с соавторами в 1970-е годы. Результаты этих исследований показали, что при концентрации БПЛ 0,2 % при 4 °С вирус инактивируется в течение 24 ч., повышение концентрации до 0,4 % приводит к потере инфекционности за 8 ч. При проведении аналогичных исследований при температуре 37 °С было установлено, что при 0,2 % инактивация происходит за 4 ч., при 0,4 % за 1 ч. [13]. При этом было установлено, что в результате воз-

действия температуры 37°С инактивация вируса проходила быстрее, чем при 4 °С.

Селиверстов и др. [14] провели исследования по изучению влияния рН среды на инфекционную активность вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «К-58» при инактивации аминоэтилэтиленимином и БПЛ в различных концентрациях и при различных рН. В результате установлено, что инактивация вируса инфекционной бурсальной болезни эффективнее протекает при значениях инактивантов, близких к нейтральному (рН 7,0).

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, однако при инактивации других вирусов необходимо учитывать их биологические особенности, а также устойчивость к физическим и химическим факторам, так как вирус блутанга репродуцируется и сохраняет свою инфекционную и антигенную активность при рН 7,0-7,5 [15]. Низкие значения рН можно использовать для инактивации тех вирусов, которые более устойчивы в данных условиях. Данный метод эффективен в отношении вирусов с оболочкой (капсидом), для других вирусов, его возможно, совмещать с повышением температуры.

Заключение

В данной работе показаны результаты исследований динамики инактивации вируса блутанга БПЛ с учетом влияния различных концентраций, температуры и рН реакционной среды на инфекционные и антигенные активности вируса блутанга. По завершении проведенных исследований оптимальными параметрами инактивации БПЛ вируса блутанга являются: конечная концентрация инактиванта 0,1%, температура реакционной среды (37±0,5) °С, значение рН реакционной среды (7,0-7,4), продолжительность инактивации 12 часов. При данном режиме инактивации сохраняются антигенные свойства вируса блутанга, что отражается на качестве и эффективности вакцин.

Литература

1. Hunter P., *Modumo J.* A monovalent attenuated serotype 2 bluetongue virus vaccine confers homologous protection in sheep. *Onderstepoort J Vet Res.* 2001 Dec; 68(4), - p.331-3.
2. Dingu BK., Louw I, Potgieter Ch, Teichman B.F. von. Attenuated Live Bluetongue Virus 8 Vaccine Protects Sheep from Challenge with the European BTV-8. *The Open Veterinary Science Journal.* 2008, 2, - p.130-133
3. Zhugunissof K., Yershebulov Z., Barakbayev K., Bulatov Y., Taranov D., Amanova Z., Abdurai-

mov Y. Duration of protective immunity after a single vaccination with a live attenuated bivalent bluetongue vaccine. *Veterinary Research Communications*, 2015. 39(4), -p.203-210.

4. *Eschbaumer M., Hoffmann B., König P., Teifke JP, Gethmann JM, Conraths FJ, Probst C, Mettenleiter TC, Beer M.* Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. *Vaccine*. 2009 Jun 24; 27(31), -p.4169-4175.

5. *Бальшиева В.И., Закутский Н.И., Лаптева О.Г., Горшкова Т.Ф., Бальшиев В.М., Цыбанов С.Ж., Новикова М.Б., Федоров Г.П., Дмитренко В.В., Нестеров Е.А.* Эффективность инактивированной вакцины против вируса блютанга 8-го серотипа // Журнал Ветеринария, 2008. №11. - с. 20-22

6. *Savinia G, MacLachlan N.J, Sanchez-Vizcaino JM, Zientarad S.* Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 31 (2008), - p.101-120

7. *Bhanuprakash V., Indrani BK, Hosamani M, Balamurugan V., Singh RK.* Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, 8(2), -p.191-204

8. *Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И.* Вирусы и вирусные вакцины. М.: Библионека, 2007, - с. 524

9. *Жугунисов К.Д., Абдураимов Е.О., Кошематов Ж.К., Нурабаев С., Таранов Д.С., Ажибаев А., Ершебулов З.Д.* Выбор эффективного инактиванта и оптимизация условий инактивации вируса катаральной лихорадки овец. – КазАТУ им. Сейфулина, 2009, №2, - с. 35-41

10. *Dermer O., Ham G.* Ethyleneimine and other Aziridines // *Acad. Press. New York*, 1969. - p.65-68

11. *Denmark : revivig agter pseudorabies Pig American.* 1983, 8(11), - p.48-49.

12. *Parker J, Hernimann K.A.J. & Gibbs E.P.J.* (1975). – An experimental inactivated vaccine against bluetongue. *Vet. Rec.*, 96, - p. 284-287.

13. *Хлыбова Т.В.* «Экспериментальная исследования по разработке метода приготовления инактивированной вакцины против КЛЮ». Дисс. на соискание уч. степ., канд.вет.наук. пгт Гвардейский, 1974 г.

14. *Селиверстов А.В., Борисов А.В., Кузнецов В.Н.* Инактивация вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «К-58». Труды федерального центра Охраны здоровья животных, Владимир, 2010. - Т. VIII. - с.148-155

15. *Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В.* Диагностика вирусных болезней животных. М.; ВО Агропромиздат, 1991. - с. 393-400