

Литература

1. Иванова Т.А., Воскресенский А.М., Кучинская Е.А. Базовые модели переработки полимерных и природных высокомолекулярных материалов. - СПб, ВГСХА, 2003. - 192 с.
2. Иванова Т. А. Химия окружающей среды и техника ее защиты. - ВГСХА, 1999.- 228с.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАТНОГО СОБАЧЬЕГО ИНТЕРФЕРОНА «ФАНИФЕРОН»

¹П.А.Красочко, ²В.А.Прокулевич, ¹Е.Е.Патиевская

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии
им. С.Н.Вышелесского», e-mail: krasochko@mail.ru

²Белорусский государственный университет

Аннотация. Приведены основные параметры изучения качества препарата на основе рекомбинатного собачьего интерферона Фаниферон. Показано, что для его оценки используются такие показатели, как определение внешнего вида, безвредности, стерильности, противовирусной активности концентрации водородных ионов.

Ключевые слова: интерферон, вирусные инфекции собак, активность, безвредность, стерильность.

Широкое распространение инфекционных заболеваний у плотоядных животных приводит к значительному экономическому ущербу, который складывается из высокой заболеваемости животных, их гибели и огромных затрат на лечение, профилактику и дезинфекцию.

В этиологической структуре вирусных инфекций плотоядных ведущую роль играют вирусы чумы плотоядных, парвовирусного энтерита и аденовирусного гепатита. Из данных литературы видно, что эти заболевания часто протекают в виде ассоциаций. Разработка средств терапии инфекционных заболеваний плотоядных животных является одной из важных и актуальных проблем ветеринарии. Широко применяемые с этой целью антибиотики и химиопрепараты наряду с положительным воздействием на течение заболевания вызывают ряд негативных побочных эффектов: аллергические реакции, возникновение антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов, повреждающее действие костной ткани, развитие дисбактериоза кишечника, угнетение иммунологической реактивности организма, гиповитаминозы, нарушение обмена аминокислот, микро- и макроэлементов. Применение терапевтических средств при вирусных инфекциях должно избирательно и специфически подавлять репродукцию вирусов и не затрагивать процессы жизнедеятельности клеток и систем организма. Из известных в настоящее время средств, обладающих противовирусным действием, практическое применение смогли найти лишь

отдельные, одними из которых являются интерфероны. Интерфероны относятся к биологическим противовирусным неспецифическим средствам. Они представлены практически во всех клетках организма и направлены на подавление репликации вирусов, их элиминацию и санацию организма. Схематически механизм действия интерферонов можно представить следующим образом: интерфероны связываются в клетке со специфическим рецептором, что ведет к синтезу клеткой около тридцати протеинов. В частности, синтезируются регуляторные пептиды, которые препятствуют проникновению вируса в клетку, синтезу новых вирусов в клетке, стимулируют активность цитотоксических Т-лимфоцитов и макрофагов. Антивирусное действие интерферонов происходит не непосредственно при взаимодействии их с вирусом, а опосредованно через клеточные реакции. Ферменты и ингибиторы, синтез которых индуцирован интерфероном, блокируют начало трансляции чужеродной генетической информации, разрушают молекулы информационных РНК вируса. Взаимодействуя с клетками иммунной системы, стимулируют фагоцитоз, активность естественных киллеров, экспрессию главного комплекса гистосовместимости. Непосредственно воздействуя на В-клетки, интерферон регулирует процесс антителообразования.

Целью исследования явилась разработка методов контроля ветеринарного препарата «Фаниферон» на основе рекомбинатного собачьего α - и γ - интерферона.

Препарат Фаниферон на основе рекомбинатного α - и γ -интерферона должен соответствовать физико-химическим и биологическим показателям, указанным в таблице.

Контроль качества упаковки и маркировки, внешнего вида, цвета препарата и наличия в нем посторонних примесей и плесени контролируют визуально.

Таблица

Физико-химические и биологические показатели препарата, полученного на основе рекомбинатного α - и γ -интерферона

Наименование показателя
1. Внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей и плесени
2. Наличие посторонних примесей, трещин ампул или флаконов, изменение внешнего вида
3. Показатель концентрации водородных ионов, рН
4. Стерильность
5. Токсичность (безвредность)
4. Противовирусная активность, МЕ/мл

Для определения внешнего вида, цвета препарата и наличия в нем посторонних примесей и плесени флаконы с препаратом просматривают в проходящем свете. Внешний вид, цвет препарата и наличие в нем посторонних примесей и плесени во флаконах полимерных определяют, переливая поочередно содержимое флаконов с препаратом в мерный цилиндр, и просматривают в проходящем свете.

Для определения объема препарата используют один флакон с препаратом. Содержимое флакона переливают в цилиндр мерный необходимой вместимости. Тара оставляется в перевернутом положении над цилиндром мерным в течение 3-5 мин. После этого измеряют действительный объем препарата в единице потребительской тары.

Определение стерильности проводят методом прямого посева или методом мембранной фильтрации.

Для определения токсичности (безвредности) препарата в мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,8 см³ препарата, стерильной дистиллированной водой доводят объем до метки и перемешивают. Приготовленный раствор препарата вводят с помощью одноразового шприца однократно подкожно в области спины пяти клинически здоровым белым мышам по 0,5 см³. Наблюдение за животными проводят в течение пяти суток.

Противовирусную активность препарата определяли по задержке цитопатогенного действия (противовирусной активности) вируса в культуре клеток.

В работе использовали культуру клеток линии «MDCK» и вирус репродуцированной в культуре клеток линии «MDCK».

Определение активности препарата включает в себя следующие этапы:

-приготовление ростовой среды;

-приготовление поддерживающей среды;

-определение инфекционного титра вируса микрометодом на плашках;

-оценка активности препарата;

Для приготовления ростовой среды использовали среду Игла или 199 с 10% сыворотки крови и антибиотиками. В качестве поддерживающей среды - среда Игла или 199 с антибиотиками, но без сыворотки.

Для оценки титра вируса в стерильных планшетах готовили десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости (от $1:10^{-1}$ до $1:10^7$). В качестве разбавителя использовали поддерживающую среду. В каждую лунку планшета с монослоем клеток MDCK вносили по 200 мкл каждого разведения вируса (на одно разведение не менее четырех лунок). Для контроля культуры клеток вносили по 100 мкл среды 2. Планшеты инкубировали 24-48 часов в CO_2 -инкубаторе при температуре $37\pm 1^{\circ}C$ в атмосфере с объемной долей углекислого газа $(5,0\pm 0,5)\%$. Под микроскопом (при увеличении в 100 раз) производили оценку тканевого цитопатического действия (ТЦД), оказываемого вирусом на клетки. Инфекционный титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. Для проведения контроля противовирусной активности использовали разведение, соответствующее 100 ТЦД в объеме 100 мкл (рабочая доза вируса).

Для оценки противовирусной активности препарата готовили десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-6} и вносили по 100 мкл в

каждую лунку. Для контроля клеточного монослоя вносили по 100 мкл поддерживающей среды. В 16 лунок предназначенных для контроля рабочей дозы вируса вносили по 100 мкл поддерживающей среды. По истечении 2-4 часов с момента внесения испытуемого препарата на культуру клеток в каждую лунку планшета вносили рабочее разведение вируса в объеме 100 мкл. Планшеты инкубировали в течение 24 ч в термостате. После чего проводили учет результатов. Учет проводили после появления ТЦД в лунках контроля рабочей дозы 100 ТЦД при условии отсутствия признаков дегенерации в контрольной культуре (без добавления образцов субстанции и вируса). За титр противовирусной активности исследуемого образца принимали максимальное разведение препарата, подавляющее развитие ТЦД в 50% инфицированных культур клеток.

Для определения показателя концентрации водородных ионов препарата отбирали 50,0 см³ и переносили в стакан, тщательно перемешивали и применяли для контроля, согласно инструкции к измерительному прибору. За результат контроля принимают среднее арифметическое значение трех определений, допустимое расхождение между которыми не должно превышать 0,2 единицы рН.

Таким образом, проведение контроля качества ветеринарного препарата «Фаниферон» на основе рекомбинатного собачьего α - и γ - интерферона позволило получить активный биологический препарат для лечения вирусных инфекций собак.