

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЖИВИХ ВАКЦИН МЕТОДОМ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

А. Ю. Ющенко¹, аспірант,
З. С. Клестова¹, д-р вет. наук, професор,
Г. В. Дорожжінський², канд. техн. наук,
О. Ф. Блоцька¹, канд. біол. наук,
В. П. Маслов², д-р техн. наук, професор,
Ю. В. Ушенін², науковий співробітник,
С. О. Кравченко², канд. х. наук

¹Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

²Інститут фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова НАН України,
проспект Науки, 45, Київ, 02000, Україна

Виробництво живих вакцин потребує швидких, ефективних методів контролю їх якості, в тому числі визначення активності. У сучасному світі розвивається напрямок пошуку альтернативних методів досліджень, які б могли замінити модельні живі біологічні об'єкти. Авторами даної статті проводиться пошук нових альтернативних шляхів в системі in vitro визначення кількості антигену (в даному випадку вакцинного та нативного вірусу ньюкаслської хвороби курей) шляхом застосування явища поверхневого плазмонного резонансу, що не потребує використання живих організмів. Для цього було використано стандартний штамп вірусу ньюкаслської хвороби курей «Ла-Сота». Для проведення досліджень явища поверхневого плазмонного резонансу використано портативний прилад «Плазмон» з чутливим сенсорним елементом, створеним на базі нанотехнологій в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАНУ. Вірус і сироватку використовували для реакції зв'язування антиген-антитіло у розведеннях. Виявили значну різницю за кінетикою взаємодії комплексу антиген-антитіло за застосування вірусу з виробничої серії ліофілізованої вакцини та при застосуванні нативного вірусу. Крім того, доведено отримання кращого результату за розведення вакцинного вірусу у буферних розчинах принаймні 1:100 для зменшення впливу домішок у складі вакцини для отримання достовірного результату вимірювання. Наші пілотні дослідження відкривають нові можливості в галузі вакцинології, а саме при контролі якості вакцин. Застосований метод не потребує використання тварин або курячих ембріонів, що вигідно як з точки зору дотримання біоетичних принципів в експерименті, а також є менш фінансово витратним. Крім того, отримання результату значно скорочено в часі в порівнянні з іншими методами. Розпочаті дослідження потребують масштабніших експериментів.

Ключові слова: КОНТРОЛЬ ВАКЦИН, НЬЮКАСЛСЬКА ХВОРОБА, ПОВЕРХНЕВИЙ ПЛАЗМОННИЙ РЕЗОНАНС.

Ньюкаслська хвороба (НХ) – гостре інфекційне захворювання, що характеризується високим рівнем контагіозності та летальності. Економічні збитки, спричинені НХ, складаються з прямих та непрямих витрат, є найбільшою перепоною у благополуччі галузі птахівництва в Україні та у світі.

Контроль вакцин, що завозяться з метою реєстрації або уже наявні на ринку, є питанням надзвичайної важливості, оскільки вакцинація є єдиним профілактичним заходом у системі боротьби з даною хворобою.

Один з основних показників якості вакцин є інфекційна активність. Дослідження за даним показником передбачає титрацію вірусу в курячих ембріонах, при цьому результат виражають в ембріон-інфікуючих дозах ЕІД₅₀ і розраховують за методом Ріда і Менча або Кербера. Для цього готують десятикратні розведення вакцини і з кожного розведення вносять по 0.1мл суспензії в алантоїсну порожнину ембріона віком 9-10 діб. Після 5-7 днів інкубації за температури 37°C зі зразками відібраної алантоїсної рідини досліджують гемаглютинуючу активність, що є індикатором наявності живого вірусу в вакцині [1].

Дана методика, що визнана стандартом, передбачає використання великої кількості курячих ембріонів та значної витрати часу на дослідження. Тому контроль якості вакцин за допомогою приладів на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР) має суттєві переваги у порівнянні із «золотим стандартом». Основними перевагами є: 1. висока чутливість пристрою – можливість детекції найменших концентрацій речовини у дослідному зразку; 2. мінімалізація супутніх витрат на матеріали; 3. значне скорочення часу проведення досліджень (близько 1-2 годин); 4. біоетичні аспекти – відсутність необхідності проведення досліджень на живих об'єктах.

Матеріали і методи. Методичною основою запланованих досліджень були теоретичні загальнонаукові прийоми досліджень і методи, що ґрунтуються на сучасних наукових засадах з розробки нових методів детекції патогенів вірусних захворювань тварин, а також фізичних основ явища поверхневого плазмонного резонансу.

У дослідженні було використано ліофілізований вірус ньюкаслської хвороби, штам «Ла-Сота», із титром інфекційної активності 9,66 Іг ЕІД_{50/см³}, вакцина проти ньюкаслської хвороби птиці зі штаму «Ла-Сота» із титром 7,57 Іг ЕІД_{50/см³}, та сироватка специфічна позитивна, титр в РГГА 1:128. Антиген і вакцину розводили 1:10 і 1:100 разів, а розведення сироватки робили 1:100 і 1:1000 разів.

Дослідження взаємодії антиген-антитіло методом ППР виконували на приладі «Плазмон-6» (рис.1), розробленому в Інституті фізики напівпровідників імені В.С. Лашкарьова НАН України [2].



Рис. 1. Зовнішній вигляд приладу «Плазмон-6» з ППР-сенсором

ППР-сенсор приладу «Плазмон-6» складався з напівпровідникового лазера з довжиною хвилі випромінювання 650 нм з р-поляризацією, зі скляної напівпентапризми, на робочій грані якої через імерсійну рідину було розташовано скляну пластинку з металевим чутливим елементом та фотоприймача, що вимірював інтенсивність відбитого лазерного випромінювання від межі поділу скло-метал. Чутливий елемент представляв собою тонкий шар золота товщиною 50±2 нм з адгезійним підшаром хрому товщиною 4±2 нм. На поверхню

чутливого елементу через сепараторну прокладку з політетрафторетилену товщиною 0,1 мм встановлювати вимірювальну кювету з поліметилметакрилату, котра мала два вимірювальні канали об'ємом по 5 мкл та патрубки для введення та виведення біоматеріалу, активаторів та буферного розчину. Прилади серії «Плазмон» дозволяють в реальному часі спостерігати хімічні та біохімічні реакції, котрі проходять поблизу поверхні чутливого елементу ППР-сенсору (до 0,5 мкм), за зміною кутового положення резонансної характеристики ППР – залежності інтенсивності відбитого лазерного світла вираженого через коефіцієнт відбиття R від кута його падіння на межу скло-метал. Кутувий зсув резонансної характеристики $\Delta\theta$ виникає внаслідок зміни показника заломлення досліджуваного середовища при проходженні відповідних реакцій на поверхні чутливого елементу, а прилад дозволяє працювати із рідкими середовищами в діапазоні показників заломлення від 1,33 (дистильована вода) до 1,41. За допомогою спеціального програмного забезпечення прилад записує кінетику зміни резонансного мінімуму в реальному часі. Межа детектування приладу становить 10 кут. сек, що відповідає зміні показника заломлення на величину $3 \cdot 10^{-5}$.

Чутливі елементи ППР-приладу «Плазмон-6» виготовляли за технологією відповідно до способу [3]. Функціоналізацію металевої поверхні чутливих елементів з наступною її активацією виконували за методикою, вказаною в роботі [4]. Біоматеріал по черзі прокачували через один канал вимірювальної кювети перистальтичним насосом зі швидкістю 10 мкл/хв. для розчинів антигену, вакцини та сироватки та зі швидкістю 50 мкл/хв. для решти біоматеріалу. Така швидкість була обрана для мінімізації перепадів тиску у кюветі та забезпечення ламінарного руху рідини. Спочатку на функціоналізовану та активовану поверхню чутливого елементу ППР-сенсору осаджували (іммобілізували) розчин антигену та розчин вакцини, після чого прокачували сироватку для зв'язування їх антигеном. Другий канал був референтний і містив фізіологічний розчин для компенсації впливу зовнішніх факторів, таких як зміна температури навколишнього середовища. Всі дослідження проводилися за кімнатної температури (22 ± 1 °C).

Результати й обговорення. Кінетика взаємодії антигену вірусу НК в розчинах вакцини різної концентрації (1:10 та 1:100) з розчином специфічної сироватки однакової концентрації (1:100) наведено на Рис.2. Більше значення відгуку ППР-сенсору на взаємодію антигену з антитілами виворотки з антигенами у розчині з меншою концентрацією вірусу пов'язано з меншим негативним впливом домішок присутніх у вакцині, як на іммобілізацію антигену на чутливий елемент сенсору, так і на саму взаємодію антиген-антитіло. Тобто, чим більше розведення вакцини, тим менша концентрація домішок.

Додатково для порівняння було досліджено взаємодію антиген-антитіло для чистого вірусу у розведенні 1:100 в фізіологічному розчині (рис. 3). Експеримент показав, що сигнал взаємодії, виміряний ППР-сенсором, у цьому випадку був трохи більший (392 кут. сек), ніж для розчину вакцини такої ж концентрації (385 кут. сек). Це також пов'язано з впливом домішок у складі вакцини.

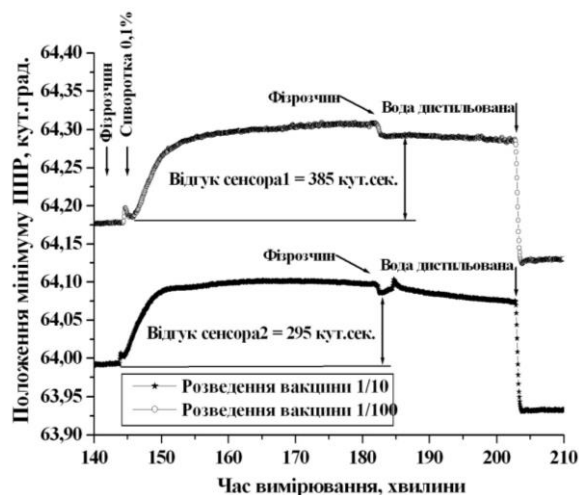


Рис. 2. Кінетика взаємодії антиген-антитіло для двох концентрацій розчинів вакцин проти ньюкаслської хвороби птиці 1:10 та 1:100.

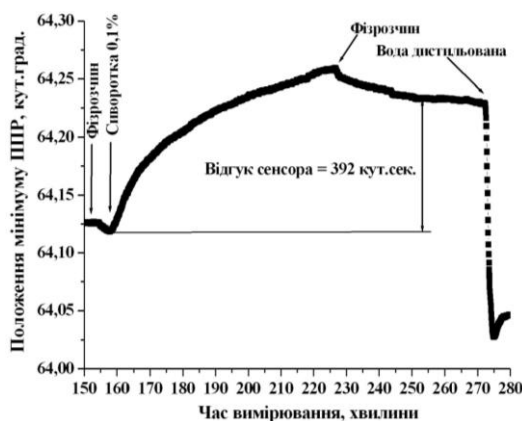


Рис.3. Кінетика взаємодії антиген-антитіло для розчину вірусу ньюкаслської хвороби у розведенні 1:100.

ВИСНОВКИ

1. Таким чином, нами попередньо доведена можливість застосування явища плазмонного резонансу для контролю якості вакцин, що потребує подальших досліджень.

2. Попередні результати показали, що при дослідженні вакцин методом ППР необхідно використовувати їх розведення для зменшити впливу домішок у складі вакцини на достовірність результату вимірювання.

Перспективи досліджень. Пілотні дослідження, що представлені у даній статті, відкривають нові можливості в галузі вакцинології, а саме для контролю якості ветеринарних вакцин. Застосований метод не потребує використання тварин або курячих ембріонів, що вигідно як з точки зору дотримання біоетичних принципів в експерименті, а також є менш фінансово витратним. Крім того, отримання результату значно скорочено в часі у порівнянні з іншими методами. Розпочаті дослідження потребують більш масштабних експериментів.

THEORETICAL RATIONALIZATION FOR QUALITY CONTROL OF LIVING VACCINES BY THE SURFACE PLASMON RESONANCE METHOD

A. Yushchenko¹, Z. Klestova¹, G. Dorozinsky², O. Blotskaya¹, V. Maslov², Yu. Ushenin², S. Kravchenko²

¹State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine

²Institute of Semiconductor Physics V.E. Lashkarev National Academy of Sciences,
45, boulevard nauky, Kyiv, 02000, Ukraine

S U M M A R Y

The production of live vaccines requires fast, effective methods to control their quality, including the definition of activity. In modern world, the direction of searching for alternative methods of research that could replace the model of live biological objects is developing. The authors of this article lookin for new alternative ways in the in vitro system to determine the amount of antigen (in this case, the vaccine and native virus of Newcastle disease of chickens) by applying the phenomenon of surface plasmon resonance, that does not require to use of live organisms. For this purpose, a standard strain of the Newcastle virus "La Sota" was used. For conducting studies of the phenomenon of surface plasmon resonance a portable device "Plasmon" with a sensitive sensor element, created on the basis of nanotechnologies in the Institute of Semiconductor Physics V.E. Lashkarev National Academy of Sciences. The virus and serum were used to bind the antigen-antibody in dilutions. A significant difference was found in the kinetic of an interaction of antigen-antibody complex in case of using the production line of virus from freeze-dried vaccine and for the native virus. In addition, better result was shown for vaccine virus in buffer solutions by dilution for at least 1:100 to reduce the effect of impurities in vaccine to obtain a reliable measurement result. Our pilot studies open the new opportunities in the field of vaccine quality control. The applied method does not require to use animals or chicken embryos, which is beneficial both from the point of view of observance of bioethical principles in experiment, and also is less financially expedient. In addition, getting the result is significantly shorter in time in comparison with other methods. Initiated research requires more extensive experiments.

Keywords: CONTROL OF VACCINES, NEWCASTLE DISEASE, SURFACE PLASMON RESONANCE.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЖИВЫХ ВАКЦИН МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

А. Ю. Ющенко¹, З. С. Клестова¹, Г. В. Дорожнинский², О. Ф. Блоцкая¹, В. П. Маслов², Ю. В. Ушенин², С. А. Кравченко²

¹Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов
ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Украина

²Институт физики полупроводников имени В. Е. Лашкарёва НАН Украины,
бульвар науки, 45, г. Киев, 02000, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Производство живых вакцин требует быстрых, эффективных методов контроля их качества, в том числе определение активности. В современном мире развивается

направление поиска альтернативных методов исследований, которые могли бы заменить модельные живые биологические объекты. Авторами данной статьи проводится поиск новых альтернативных путей в системе *in vitro* для определения количества антигена (в данном случае, вакцинного и нативного вируса ньюкаслской болезни кур) путем применения явления поверхностного плазмонного резонанса, который не требует использования живых организмов. Для этого был использован стандартный штамм вируса ньюкаслской болезни кур «Ла-Сота». Для проведения исследований явления поверхностного плазмонного резонанса использован портативный прибор «Плазмон» с чувствительным сенсорным элементом, созданным на базе нанотехнологий в Институте физики полупроводников им. В.Е. Лашкарёва НАНУ. Вирус и сыворотку использовали для реакции связывания антиген-антитело в разведениях. Обнаружили значительную разницу по кинетике взаимодействия комплекса антиген-антитело при применении вируса из производственной серии лиофилизированной вакцины и при применении нативного вируса. Кроме того, доказано получение лучшего результата при разведении вакцинного вируса в буферных растворах по крайней мере 1:100 для уменьшения влияния примесей в составе вакцины для получения достоверного результата измерения. Наши пилотные исследования открывают новые возможности в области вакцинологии, а именно при контроле качества вакцин. Примененный метод не требует применения животных или куриных эмбрионов, что выгодно как с точки зрения соблюдения биоэтических принципов в эксперименте, а также менее финансово затратно. Кроме того, получение результата значительно сокращено во времени по сравнению с другими методами. Начатые исследования требуют более масштабных экспериментов.

Ключевые слова: КОНТРОЛЬ ВАКЦИН, НЬЮКАСЛСКАЯ БОЛЕЗНЬ, ПОВЕРХНОСТНЫЙ ПЛАЗМОННЫЙ РЕЗОНАНС.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. OIE Terrestrial Manual 2018 // P. 976. Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
2. *Дорожинський Г. В.* Сенсорні прилади на основі поверхневого плазмонного резонансу / *Дорожинський Г. В., Маслов В. П., Ушенін Ю. В.* // Київ: НТУУ «КПІ» видавництво «Політехніка», 2016. – 264с. ISBN 978-966-622-752-5.
3. *Dorozinsky G. V.* Influence of technological factors on sensitivity of analytical devices based on surface plasmon resonance / *Dorozinsky G. V., Doroshenko T. P., Maslov V. P.* // *Journal of Sensor Technology.* 2015; 5: 54-61.
4. Експериментально-теоретичне обґрунтування розробки експрес методу виявлення ентеровірусів у воді методом поверхневого плазмонного резонансу / *Клестова З. С., Ющенко А. Ю., Блоцька О. Ф. та ін.* // *Innovative Biosystems and Bioengineering, Vol. 3, Issue 1,* (2019), 52-60.
5. Development High Sensitivity Sensors Based on Surface Plasmon Resonance Phenomenon / *Maslov V., Ushenin Yu., Dorozinsky G. et al.* // *Confer. Proceed / Igor Sikorsky Kyiv Politechnic Inst. - 2019 IEEE 39th Intern. Confer. On Electronics and Nanotechnology (ELNANO).* - P. 249-252.
6. Influence of Temperature on the Measuring Accuracy of Devices Based on Surface Plasmon Resonance Phenomenon / *Dorozinska H.V., Turu T.A., Markina O.M. et al.* // *Modern Instrumentation.* – 2018. - Vol. 7. – P. 1-10.

References

1. OIE Terrestrial Manual 2018 // P. 976. Credit: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf
2. *Dorozinsky G.V., Maslov V.P., Ushenin Yu.V.* Sensorni prylady na osnovi poverhneвого plazmonnogo rezonansu // *Kyiv: NNTU «KPI» vydavnyctvo «Politehnika», 2016. – 264 s. ISBN 978-966-622-752-5 [in Ukrainian].*

3. Dorozinsky G.V, Doroshenko T.P, Maslov V.P. Influence of technological factors on sensitivity of analytical devices based on surface plasmon resonance // Journal of Sensor Technology. 2015; 5: 54-61.

4. Klestova Z.S., Yushchenko A.Yu., Blotskaya O.F., Maslov V.P., Ushenin Yu.V, Dorozinsky G.V., Dorozinska G.V. Eksperymentalno-teoretychne obgruntuvannya rozrobky ekspres metody vyjavlennya enterovirusiv y void metodom poverhneвого plazmonnogo rezonansu // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2019. – Vol. 3(1). – P.52-60 [in Ukrainian].

5. Maslov V., Ushenin Yu., Dorozinsky G., Klestova Z., Blotskaya O., Yushchenko A., Dorozinska H. Development High Sensitivity Sensors Based on Surface Plasmon Resonance Phenomenon // Confer. Proceed / Igor Sikorsky Kyiv Politechnic Inst. - 2019 IEEE 39 th Intern. Confer. On Electronics and Nanotechnology (ELNANO). - P. 249-252

6. Dorozinska H.V., Turu T.A., Markina O.M., Dorozinsky G.V., Maslov V.P. Influence of Temperature on the Measuring Accuracy of Devices Based on Surface Plasmon Resonance Phenomenon // Modern Instrumentation. – 2018. – Vol. 7. – P. 1-10

Рецензент – В. Л. Коваленко, д. вет. н., професор, ДНКІБШМ.

doi: 10.36359/scivp.2019-20-2.52

EFEKTYWNOŚĆ WYKORZYSTANIA FERMENTOWANEJ POEKSTRAKCYJNEJ ŚRUTY RZEPAKOWEJ W ŻYWIENIU LOCH

Anna Czech, Martyna Kiesz, Sylwia Kłos

Katedra Biochemii i Toksykologii Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 13 20-950 Lublin, Polska

Celem badań była ocena efektywności stosowania fermentowanej poekstrakcyjnej śruty z rzepaku w mieszankach dla loch w okresie ciąży i laktacji na podstawie wskaźników produkcyjnych, wartości wybranych wskaźników odpornościowych, a także zawartości składników mineralnych w sianie i krwi. Doświadczenie przeprowadzono na 40 lochach, przydzielonych równomiernie do dwóch grup żywieniowych tj. grupy kontrolnej (K) oraz grupy doświadczalnej (D) żywionej mieszanką z 9% udziałem fermentowanej poekstrakcyjnej śruty rzepakowej (FR) w miejsce poekstrakcyjnej śruty sojowej. Doświadczenie rozpoczęto w dniu potwierdzenia ciąży metodą ultrasonografii (USG) (ok. 3 tygodnia ciąży) a zakończono w 27 dniu laktacji (odsadzenie prosiąt).

Efektywność żywienia świń oceniano na podstawie liczebności miotu i masy ciała prosiąt przy urodzeniu i odsadzeniu, zużycia paszy oraz zdrowia zwierząt. W czasie całego okresu prowadzono obserwacje zdrowia i kondycji zwierząt. Podczas trwania doświadczeń kontrolowano ilościowo spożycie pasz. Próbkę krwi, pobrano od zwierząt w następujących okresach: wysoka ciąża (ok. 100 dzień ciąży), laktacja (ok. 27 dzień laktacji), a także od prosiąt ok. 27 dzień życia (koniec laktacji). W pełnej krwi na aparacie ABACUS-Vet oznaczono liczbę krwinek białych (WBC) i procentowy udział limfocytów (LIM). Obliczono również liczbowy stosunek granulocytów do limfocytów (G:L). Koncentracja przeciwciał IgA, IgG w osoczu krwi oraz w sianie loch oznaczano ilościowo. Podstawowy skład chemiczny siary oznaczano klasycznymi metodami przy pomocy aparatu Milko-Scan 104 (A/S N. Fooss Electric, Dania). Zawartość wapnia, żelaza, miedzi i cynku w paszy, krwi i sianie oznaczono metodą spektrometrii absorpcji atomowej (ASA), a zawartość fosforu ogólnego w paszy według metody Fiske-Subbarowa [12]. Fermentacja poekstrakcyjnej śruty rzepakowej jest