

DETERMINATION OF THE OPTIMAL CORRELATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS AND NEWCASTLE DISEASE VIRUS ANTIBODIES AT THE DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY OF PREPARATION OF INACTIVATED EMULSIVE ASSOCIATED VACCINE AGAINST HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA AND NEWCASTLE DISEASE

Stegniy A.B., Golovko V.O.

Kharkiv State Zooveterinary Academy

Results of study of antigenic characteristics of combined inactivated preparations with different correlation of highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease viruses are presented in the paper. Dynamics of formation of antibodies to the agents of these diseases at introduction to chickens antibody correlations 1:1, 1:2, 2:1 has been determined. Optimal correlation of antigens, which ensure high level of antibodies and which may be used at production of inactivated vaccine against highly pathogenic avian influenza and Newcastle disease has been determined.

УДК 578.825.13:616

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ELISA ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ПРОТИ ВІРУСІВ ХВОРОБ АУЄСКИ Й ТЕШЕНА

Стегній Б.Т., Бузун А.І., Антонов В.С., Борисова О.Л., Коваленко Л.В., Руденко О.П., Михайлова С.А., Усова Л.П., Вовк С.І.

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

Метою досліджень було одержати компоненти та відпрацювати параметри тест-системи для постановки ІФА щодо визначення антитіл проти вірусів хвороби Ауєска (ХА) й Тешена (ХТ). Було виготовлено вірусні антигени, позитивні й негативні сироватки, імунопероксидазний кон'югат. Підібрано параметри проведення реакції: рН буферних розчинів, кількісний, температурний і часовий режими адсорбції реагентів, їх біологічна активність, фермент-субстратні співвідношення. У результаті проведених досліджень було встановлено, що розроблена тест-система відповідає чинним вимогам СОУ 01-37-176:2004.

Хвороби Ауєска (ХА) й Тешена (ХТ) становлять серйозну проблему для вітчизняного свинарства [1, 2]. Одним з головних заходів нагляду ХА й ХТ і прогнозування епізоотичної ситуації є серологічний моніторинг популяцій диких і свійських свиней, який здійснюється за допомоги серологічних методів, головним чином – реакції нейтралізації (РН) й класичного методу ELISA [3, 4]. Застосування методу ELISA, перш за все, зумовлено його суттєвими перевагами перед іншими методами: він забезпечує високу продуктивність праці; експресність, високі чутливість та специфічність виявлення антитіл; стабільність реагентів, автоматизацію постановки та обліку результатів реакції. В Україні вже створено технології виготовлення тест-систем ELISA: окремо, для діагностичного супроводу вакцинопрофілактики ХА [1, 4] та для лабораторної ідентифікації антитіл проти ХТ [2, 4]. Метою наших досліджень було створення тест-системи ELISA для діагностичного супроводу розробленої в ННЦ «ІЕКВМ» комплексної програми контролювання нейроінфекцій свиней у рамках держбюджетної теми № д/р 0107U003197.

Матеріали і методи. Для одержання вірусних антигенів використовували епізоотологічно актуальні для України штами УНДІЕВ-18в вірусу ХА [5] та «Бучач» [6], селекціоновані за ознакою імуногенності в перешеплюваній культурі клітин РК-15, для комплексної вакцинопрофілактики ХА й ХТ. Партію стаціонарних культур клітин у матрасах заражали вірусами в дозах, відповідно, 0,01 ТЦД вірусу ХА/клітину та 0,001 ТЦД вірусу ХТ/клітину, з забезпеченням відповідних норм санітарного режиму для запобігання перехресної контамінації культур клітин.

Заражені культури клітин інкубували у термостаті за температури $(37 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ упродовж (2-3) діб до повної руйнації моношару клітин. Збір вірусної біомаси проводили після округлення та відшарування не менше 95 % клітин моношару. Перед використанням вірусну біомасу у кожній ємності перевіряли на стерильність за ДСТУ 3041-95 та інфекційну активність – за загальноприйнятим методом титрування у пробірочній культурі клітин РК15. Сировину вважали придатною для подальшої роботи, якщо вона була стерильною, а її інфекційна активність складала не менше $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$. При одержанні антигенів вірусвміщуючу рідину освітлювали центрифугуванням за умови 3000 об./хв – 20 хв. На наступному етапі вірус ХА за 40000 г, а ХТ, відповідно, за 60000 г упродовж 90 хв крізь 30% розчин сахарози. Очищені, як зазначено вище, антигенні матеріали центрифугували за 120000 г упродовж 60 хв. (вірус ХА) та 120 хв. (вірус ХТ), осад ресуспендували у 0,05 М трис-буфері (рН 7,5), взятого в об'ємі, що у 100 разів менше за початковий. Концентрацію білка у розчинах визначали спектрофотометрично за Бредфордом. Вона становила 0,01 – 0,07 мг/см³. Вірусні антигени зберігали до використання за температури мінус $(15 - 40) ^\circ\text{C}$.

Вірус-специфічні сироватки для формування ELISA-панелі сироваток отримували на свинях великої білої породи, серонегативних у РН щодо ХА й ХТ, шляхом їх щеплення відповідними інактивованими емульсованими моновакцинами проти ХА й ХТ, за настановами з використання вакцин. Поствакцинальні сироватки ХА (n=15) та ХТ (n=9) отримували з крові свиней-донорів через місяць після другого щеплення. Постінфекційні сироватки для ELISA-панелі сироваток відбирали з числа зразків від свійських та диких свиней у серобанку лабораторії вивчення хвороб свиней ННЦ «ЛЕКВМ», позитивних у РН щодо ХА та ХТ. Негативними сироватками для ELISA-панелі сироваток слугували сироватки свійських і диких свиней у зазначеному серобанку, негативних у РН щодо означених інфекцій, проте позитивних щодо інших інфекційних агентів свиней. Для зберігання ELISA-панелі сироваток зразки змішували з гліцерином 1:1, фасували на аліквоти по 0,25 см³ й у пластикових контейнерах переносили у морозильник побутового холодильника (мінус 8 – мінус 15 °C).

Результати досліджень. З одержаними компонентами було проведено досліді щодо відпрацювання постановки ІФА, підібрано параметри постановки реакції, а саме: рН буферних розчинів, кількісний, температурний та часовий режими адсорбції реагентів, їх біологічна активність та фермент-субстратні співвідношення.

Перед іммобілізацією на полістиролових планшетах вірусні антигени розводили натрій-карбонатним буфером з рН 9,2, 9,6 (КББ) - 1:200 – 1:1600. Відповідні розведення антиген вірусу ХА вносили у лунки 1-6 рядів, а антигену вірусу ХТ – у лунки 7-12 рядів 96-лункових полістиролових планшетів фірми Nunc (USA) або «Медтехніка» – в об'ємі 0,1 см³/лунку. Планшети інкубували впродовж 1 год за температури 37 °C або (16-18) год за температури 4 °C. Після цього вміст лунок видаляли, обробляли вірусним інактиватором та планшет інкубували за кімнатної температури впродовж 1 год. Потім вміст лунок видаляли та у всі лунки вносили по 0,1 см³ блокуючого розчину: 0,1 %-го альбуміну сироватки великої рогатої худоби або 1 %-го казеїну на ФБР, планшет інкубували 40 хв, 1 год за температури 37 °C. Після інкубації планшет промивали тричі по 5 хв фосфатним буфером з рН 7,4, який містить 0,05 % твіну-20. Зазначену процедуру сенсibilізації планшетів проводили з дотриманням вимог санрежиму у боксовому приміщенні.

Планшет з іммобілізованими вірусними антигенами зберігали за температури $(4 - 8) ^\circ\text{C}$ у герметично упакованих поліетиленових пакетах впродовж 4-12 місяців.

Для одержання імунопероксидазного кон'югату з сироватки крові підсвинків виділяли загальну гамма-глобулінову фракцію за допомогою ПЕГ-115 (з кінцевої концентрацією в розчині 8 %). Потім розчин інкубували не менш ніж 3 години за температури 4 °C для утворення осаду. Осад відділяли центрифугуванням у режимі 3000 об./хв протягом 10 хв та розчиняли у фізіологічному розчині до кінцевої масової концентрації імуноглобулінів 10 %. Далі на колонці з ДЕАЕ сефадексом А-50 було виділено імуноглобулін класу G свиней.

Для отримання антитіл проти імуноглобуліну G свиней проводили гіперімунізацію кролів за наступною схемою:

– перша імунізація – у подушечки всіх чотирьох лапок вводили по 1 см³ імуноглобуліну G свиней, змішаного з однаковим об'ємом масляного ад'юванту Фрейнда;

– друга імунізація – через місяць після першої імунізації. Ig G свиней вводили внутрішньовенно в дозі 0,5 см³. Через 7 днів перевіряли титр антитіл у реакції імунодифузії (РІД).

Після досягнення титру антитіл у сироватці крові не менше, ніж 1:16; 1:32, кролів еутаназували та відбирали сироватку. У подальшому з антисироватки виділяли імуноглобулін класу G за методикою, яка вказана раніше. Кон'югацію одержаного імуноглобуліну G з пероксидазою хрому проводили методом періодатного окислення (метод Nakane): до розчину, який містив 4 мг пероксидази хрому ($R_z = 3,0$) в 1,0 см³ води, додавали 0,2 см³ свіжоприготованого 0,1 М розчину періодату натрію та перемішували 20 хв за кімнатної температури. Одержаний розчин діалізували проти 0,001 М натрій ацетатного буфера, рН 4,4, протягом (16-18) год за температури 4 °С або хроматографували на колонці (1 x 10) см з сефадексом G-25. До модифікованої пероксидази хрому додавали 0,02 см³ 0,2 М натрій карбонатного буфера з рН 9,5 і зразу ж додавали рівну кількість імуноглобуліну G. Реакційну суміш перемішували 2 год за кімнатної температури, додавали 0,1 см³ свіжоприготованого розчину боргідриду натрію (4 мг/см³) і перемішували 2 год за температури 4 °С. Одержаний кон'югат осаджували насиченим розчином сульфату амонію та потім діалізували або хроматографували на колонці (1,6 x 35) см з сефадексом G-200, збираючи фракції, які відносяться до першого піку. Для стабілізації кон'югату додавали БСА (1 %), мертіюлят (0,02 %) або гліцерин (50 %) і зберігали за температури мінус (8 – 15) °С.

У результаті проведених досліджень було визначено оптимальні параметри ІФА, а саме: час, необхідний для адсорбції антигену на поверхні полістиролу становив 16-18 годин за температури 4 °С; для усіх наступних стадій ІФА час інкубації складав 1 годину за температури 37 °С; оптимальною буферною системою для іммобілізації антигенів на планшет виявився карбонатно-бікарбонатний буфер з рН 9,2; за оптимальну схему обрано сенсibilізацію перших шести рядів лунок планшету (№№1-6) антигеном вірусу ХА, а наступних шести рядів (№№7-12) антигеном вірусу ХТ; на інших стадіях ІФА - фосфатно-сольовий буфер (ФСБ) з рН 7,6 та фосфатно - цитратний буфер з рН 4,9-5,0; в якості блокуючого розчину – 1 % розчин казеїну.

При відпрацюванні параметрів постановки ІФА був проведений порівняльний аналіз використання кон'югатів виробництва ННЦ «ІЕКВМ» у розведенні 1:1000 та ДУ НДІЕМ ім М.Ф. Гамалії РАМН у розведенні 1:10000 (результати представлені в таблиці 1).

Таблиця 1 – Порівняльний аналіз активності кон'югатів (ННЦ «ІЕКВМ» та ДУ НДІЕМ ім М.Ф. Гамалії РАМН) (опт. щільність)

	Кон'югат ННЦ «ІЕКВМ»				Кон'югат ДУ НДІЕМ ім М.Ф. Гамалії РАМН				Конт-ролі
	Розведення сироваток				Розведення сироваток				
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:100	1:200	1:400	1:800	
A	0,282	0,250	0,213	0,175	0,354	0,255	0,205	0,175	0,112
B	0,280	0,249	0,216	0,167	0,373	0,221	0,207	0,178	0,110
C	0,140	0,109	0,104	0,100	0,135	0,123	0,109	0,100	0,115
D	0,141	0,117	0,110	0,095	0,136	0,121	0,101	0,101	0,092
E	0,160	0,131	0,123	0,110	0,156	0,135	0,120	0,105	0,089
F	0,140	0,121	0,123	0,105	0,145	0,125	0,125	0,110	0,080

Примітки: Лунки рядів АВ – позитивна сироватка до вірусу хвороби Ауескі; Лунки рядів CD – негативна сироватка до вірусу хвороби Ауескі; Лунки ряду E – дослідна сироватка крові свиней; Лунки ряду F – дослідна сироватка крові свиней; Контролі ABC12 – антиген + кон'югат; Контролі DEF12 – антиген + сироватка.

Аналіз результатів, представлених у таблиці 1, свідчить, що кон'югат (ННЦ «ІЕКВМ») за активністю не поступається кон'югату, одержаному з ДУ НДІЕМ ім М.Ф. Гамалії РАНН.

Також було проведено дослідження активності постінфекційних та поствакцинальних сироваток у серійних дворазових розведеннях з 1:100 до 1:10240, при цьому використовували кон'югат ННЦ «ІЕКВМ» у розведенні 1:1000 (рис 1).

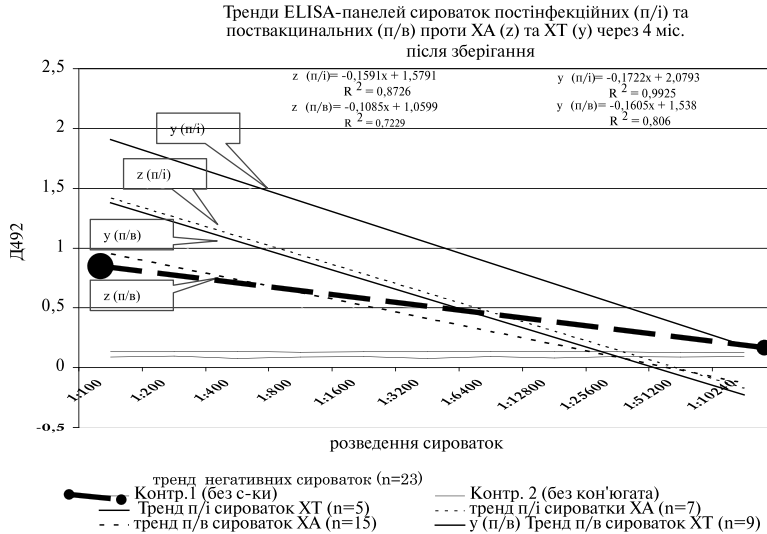


Рис.1

Нарівні вірогідності $R^2=0,72-0,99$ встановлено, що впродовж 4 місяців зберігання компоненти розробленої тест-системи ELISA не втратили вихідної активності. За попередніми даними при зберіганні 12 місяців активність компонентів набору знизилася на 10-12 % у порівнянні з вихідною.

Постінфекційні сироватки свиней, взяті через 1-3 місяці після одужання від ХА та через 1-1,5 місяці від ХТ, мали титри в середньому на 31% ($R^2=0,923$) та 47% ($R^2=0,837$), відповідно, вище, ніж поствакцинальні титри сироваток свиней, взятих через 21 – 30 діб після щеплення інактивованими вакцинами проти ХА (адсорбована) та проти ХТ (емульсована). Це вказує на можливість, при наявності достатньої епізоотологічної інформації, з певною похибкою, диференціювати розробленим методом ELISA свиней реконвалесцентів від щеплених.

Отже за результатами проведених досліджень встановлено, що розроблена тест-система є придатною для визначення антитіл до вірусів ХА й ХТ.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено, що розроблена в ННЦ «ІЕКВМ» тест-система відповідає чинним національним вимогам до якості імуноферментних тест-систем і є придатною для подальших валідаційних випробувань згідно з СОУ 01-37-176:2004.

Список літератури

1. Собко, Ю.А. Основы системы искоренения болезни Ауески в Украине. [Текст] / Собко Ю.А. – Свиноводство, 2005. – № 2. 2. Романенко, В. П. Энзоотический энцефаломиелит (хвороба Тешена) свиней. Ветеринарна медицина України, 2007. – № 4. – С. 10-12. 3. SMITH, P. C. Agar-Gel Immunodiffusion Assay for Pseudorabies Virus Antibody [Текст] / SMITH P. C., STEWART W. C. - JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 1978, – Vol. 7. – No. 5. – P. 423-425 4. Синица, В. А. Розробка і виготовлення діагностиків для імуноферментного аналізу при класичній чумі свиней, хворобі Ауескі, Тешена, бешісі, лейкозі великої рогатої худоби, трихінельозі свиней та практичне їх застосування (теоретичне обґрунтування, впровадження) [Текст] / Синица В. А. – Дис. д-ра вет. наук: 16.00.03 / УААН; Інститут ветеринарної медицини. – К., 2003. – 417 с.

DEVELOPMENT OF ENZYME IMMUNOSORBENT ASSAY FOR PORCINE ANTIBODY AGAINST PSEUDORABIES VIRUS AND TESCHOVIRUS DETECTION

Stegniy B.T., Buzun A.I., Antonow W.S., Borisowa O.L., Kovalenko L.V., Rudenko O.P., Mihaylova S.A., Usova L.P., Vovk S.I.

National Scientific Centre «Research Institute for Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

The ELISA kit manufacture regalement for Pseudorabies (PR) and Teschen disease (TD) serology is developed. Mentioned regalement include the immobilized viral antigens and reference serums preparation, as well as immunoperoxidase conjugate synthesis and finally of ELISA protocol optimization. The results of serum' panel examination by developed kit showed that kit' components was stabled for 1 year of storage on cool and allowed to detect the PR- and TD antibodies (-Ab) in serums of swine vaccinated against PR or TD as well, as recovered after these diseases. The ELISA equation for PR-Ab post-infected (p.i.) is $z_{(p.i.)} = -0,1591x + 1,5791$ ($n=7$, $R^2=0,87$); for PR-Ab post-vaccinated (p.v.) is $z_{(p.v.)} = -0,1085x + 1,0599$ ($n=15$, $R^2=0,72$); for TD-Ab is, $y_{(p.i.)} = -0,1722x + 2,0793$ ($n=5$, $R^2=0,99$) and $y_{(p.v.)} = -0,1605x + 1,538$ ($n=9$, $R^2=0,81$), respectively. It is concludes that proposed ELISA kit is ready for respectively validation trials.

УДК: 619:614.48:616.98:579.873.21

ВИЗНАЧЕННЯ БАКТЕРИЦИДНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТІВ «DESU» ЩОДО МІКОБАКТЕРІЙ

Стегній Б. Т., Завгородній А. І., Куцан О.Т.

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
Харків, Україна,

Бобош С., Гагрчин М.

Університет Нови Сад, Сербія

У статті наведені результати дослідження бактерицидної дії дезінфектантів групи «DESU» виробництва «Vet zavod-subotica» (Сербія). Визначено оптимальні параметри застосування цих препаратів (концентрація та експозиція дії) для проведення як профілактичної, так і вимушеної дезінфекції тваринницьких приміщень.

Сучасні тваринницькі підприємства різних форм власності можуть бути рентабельними тільки в тому разі, якщо вони укомплектовані здоровими високопродуктивними тваринами. Тому одним із найважливіших завдань ветеринарної науки та практики є оздоровлення тваринництва від інфекційних хвороб і особливо від туберкульозу, який завдає галузі тваринництва великих економічних збитків, а також створює загрозу для здоров'я людей і має в останні роки значне поширення в усьому світі.

У системі заходів профілактики та боротьби з туберкульозом велике значення має дезінфекція тваринницьких приміщень і об'єктів зовнішнього середовища утримання тварин [1, 2].

Відомо, що хворі на туберкульоз тварини з секретами та екскретами можуть виділяти збудника в об'єкти зовнішнього середовища, який зберігає життєздатність і патогенність протягом 6-12 місяців і через фактори передачі може потрапляти до організму сприйнятливих тварин і зумовлювати захворювання [1, 2, 3].

Для знезараження мікобактерій туберкульозу в об'єктах зовнішнього середовища застосовується велика кількість дезінфікуючих засобів, які виготовляються як у нашій країні, так і за кордоном і щорічно використовуються для профілактичної та вимушеної дезінфекції. Однак ці препарати не у всіх випадках є ефективними. Разом з цим, тривале застосування хімічних препаратів для дезінфекції може сприяти виникненню резистентних форм мікобактерій [4]. Так, проведеними дослідження-