

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

2. Визначено кореляційний зв'язок між тест-системами «Набір компонентів для визначення антитіл до вірусу інфекційної бурсальної хвороби імуноферментним методом» виробництва ННЦ «ІЕКВМ» та «Набір для определения антител к вирусу инфекционной бурсальной болезни иммуноферментным методом при тестировании сывороток в одном разведении» (ФДУ «ВНДІЗТ»). Коефіцієнт кореляції (r) при цьому становив 0,980, що свідчить про високу ступінь кореляційного зв'язку між порівнюваними тест-системами.

3. Виведено формули перерахунку $Ig(S/P)_{\text{ННЦ «ІЕКВМ»}}$ у $Ig(S/P)_{\text{ФДУ «ВНДІЗТ»}}$ для тест-систем для визначення антитіл до вірусів інфекційного бронхіту курей та інфекційної бурсальної хвороби імуноферментним методом.

Список літератури

1. Дзантиев, Б.Б. Гетерогенные методы иммуноферментного анализа [Текст] / Б.Б. Дзантиев // Бюл. ВНИИЭВ. – Выпуск 58. – 1985. – с. 10-22.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Егоров [и др.]. – М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
3. Таранов, А.Г. Диагностические тест-системы (радиоиммунный и иммуноферментный методы диагностики) [Текст] / А.Г. Таранов – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Издатель Мокеев, 2002. – 288 с.
4. Иммуноферментный анализ [Текст] / Под ред. Т.Т. Нро, Г. Ленхоффа: пер. с англ. – М.: Мир, 1988. – 444с.
5. Фримель, Г. Иммунологические методы [Текст] : пер. с англ. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

REGRESSIVE ANALYZE AND DERIVATION OF FORMULA OF RE-CALCULATION OF IFA RESULTS FOR TEST-SYSTEM OF DEVELOPMENT OF NSC «IECVM» AND FSI ARRIAH

Stegniy B.T., Usova L.P., Mihaylova S.A., Antonov V.S., Rudenko O.P., Kovalenko L.V., Matyusha L.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Results of investigations concerning the study of correlative connection between results of IFA with the help of diagnostic kits for determination of antibodies to viruses of IBC and IBD of development of FSI ARRIAH (Russian Federation) and NSC "IECVM" are presented in the article. There was established the presence of significant correlative connection between compared test-systems.

УДК 619:578.828.11:636.2:616-076

УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА АНТИГЕНУ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В РЕАКЦІЇ ІМУНОДИФУЗІЇ

Стегній Б.Т., Фісенко С.А., Стегній М.Ю., Дунаєв Ю.К., Коновалов А.В., Бабанін М.І.

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

Ензоотичний лейкоз великої рогатої худоби (*Enzootic bovine leucosis*, гемобластоз) – хронічне інфекційне захворювання, що викликається вірусом лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) з родини *Retroviridae* [1, 2]. Виділення вірусу лейкозу великої рогатої худоби, вивчення його біологічних і біохімічних властивостей дозволило розробити методи серологічної діагностики (РІД, ІФА), які є основою сучасних систем оздоровлення і профілактики господарств від цього захворювання.

Реакція імунодифузії (РІД) – серологічний метод діагностики, що базується на виявленні в сироватці крові тварин антитіл до одного з двох структурних білків ВЛ ВРХ (gp24 та p51). Цей метод рекомендовано Міжнародним Епізоотичним Бюро (МЕБ) як референс-тест з виявлення антитіл ВЛ ВРХ. Широке застосування діагностичних наборів компонентів (сухих та рідких стабілізованих) для постановки РІД, які розроблені у ННЦ «ІЕКВМ» і виготовляються ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина», показало їх високу ефективність і відповідність до міжнародних стандартів [3, 4]. Виготовлення діагностиків пов'язано з отриманням великої кількості вірусу та вірусних антигенів, джерелом яких є перещеплювана лінія клітин FLK-BLV, що хронічно інфікована ВЛ ВРХ. Важливим етапом підвищення ефективності виробництва цих діагностичних наборів є підбір оптимальних умов культивування клітин FLK-BLV, що дозволить забезпечити високий рівень виходу вірусу та його антигенів, мінімальний видаток поживних середовищ і сироваток, а також зниження трудових та енергетичних затрат.

Метою роботи було удосконалення та розробка більш ефективної та економічної технології виготовлення антигену ВЛ ВРХ.

Матеріали і методи. У роботі використовували перещеплювану лінію клітин FLK-BLV, хронічно інфіковану ВЛ ВРХ, поживні середовища 199, Ігла, нативну сироватку ВРХ і сироватку ВРХ, очищену від імуноглобулінів за допомогою методу розподільчої ультрафільтрації. В якості стимулюючих факторів випробували препарати «Актовегін» і «Інсулін», які додавали до поживних середовищ у різних концентраціях. З метою підвищення інфекційності ВЛ випробовували диметилсульфоксид (ДМСО).

Дослідження реплікації ВЛ в культурі клітин проводили за допомогою електронної мікроскопії ВЛ з використанням методу ультратонких зрізів культури FLK+BLV через 6, 12, 24, 48, 96, 120 і 240 годин культивування.

Очистку та концентрування ВЛ проводили на ультрафільтраційних модулях з порожнистими волокнами.

Оцінювали антигени ВЛ за активністю, специфічністю та кількісним виходом (доз АГ з 1 дм³ вірус-культуральної рідини).

Активність і специфічність антигену перевіряли у РІД.

Результати досліджень. Загальновідомо, що склад поживних середовищ і якість сироватки крові тварин впливають на репродукцію вірусів у культурах клітин (інгібують або стимулюють її) [5]. Були вивчені фактори, що сприяють підвищенню продуктивності культури клітин FLK-BLV. З цієї метою був випробуваний препарат «Актовегін», який має інсуліноподібну дію – стимулює транспорт глюкози у середину клітин. Препарат вносили в дозі 0,1, 0,5, 1,0 і 2,0 мг/см³ поживного середовища. Установлено, що у вищезазначених дозах «Актовегін» не проявляв токсичної дії на клітини FLK-BLV впродовж 7 пасажів (строк спостереження). Додавання препарату «Актовегін» у дозі 0,1 і 0,5 мг/см³ суттєво не впливало на ростові потенції клітин, проте в дозі 1-2 мг/см³ препарат покращував ростові властивості поживного середовища, підвищував проліферативну й антигенпродукуючу активність культури клітин FLK-BLV. Упродовж всього терміну спостереження (7 пасажів) морфологія та проліферативний потенціал клітин були стабільними. Індекс проліферації (ІП) клітин FLK-BLV складав 12,6±0,26, у той же час за культивування FLK-BLV без додавання «Актовегіну» (контроль) він становив 8,6±0,17. Титр антигену в РІД при цьому збільшувався в 1,7 рази та становив 1:7 в порівнянні з 1:4 у контролі (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив препарату «Актовегін» на проліферативну та антигенпродукуючу активність культури клітин FLK-BLV

Культура клітин	Концентрація «Актовегіну», мг/см ³	Індекс проліферації	Титр антигену в РІД
FLK-BLV	0,1	9,1±0,72	1:4,2
	0,5	8,9±0,24	1:4,1
	1,0	10,9±0,65	1:6,5
	2,0	12,6±0,26	1:7,0
	-	8,6±0,17	1:4,0

Відомо, що інсулін стимулює транспорт глюкози та нейтральних амінокислот (аланін, сірин, цистеїн, лейцин і ін.) у тканинах тварин, таким чином підвищує метаболічні процеси [6]. У зв'язку з цим було вивчено вплив препарату «Інсулін» на проліферацію клітин FLK-BLV, реплікацію ВЛ та продукцію його антигену. «Інсулін» додавали у дозі 0,5, 1 та 2 од./см³ поживного середовища, яке містило суміш середовищ Ігла та 199 (1:1) і 10 % сироватки крові ВРХ. Установлено, що додавання «Інсуліну» в дозі 0,5 од./см³ суттєво не впливало на проліферацію клітин та рівень накопичення антигену ВЛ. Додавання його в дозі 1 та 2 од./см³ поживного середовища посилювало проліферацію клітин FLK-BLV, прискорювало термін виповнення моношару та підвищувало реплікацію вірусу та продукцію його антигенів. ІП становив 18,6±0,12, титр антигену ВЛ – 1:6,5. У той же час, у контролі (без застосування інсуліну) ІП був 8,6±0,17 (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив препарату «Інсулін» на проліферативну та антигенпродукуючу активність культури клітин FLK-BLV

Культура клітин	Концентрація «Інсуліну», од./см ³	Індекс проліферації	Титр антигену в РІД
FLK-BLV	0,5	9,9±0,44	1:4,3
	1,0	15,3±0,11	1:5,8
	2,0	18,6±0,12	1:6,5
	контроль	8,6±0,17	1:4,0

Крім того, було вивчено дію ДМСО на продуктивні та проліферативні властивості культури клітин FLK-BLV. Установлено, що додавання 1 % ДМСО до поживного середовища підвищувало строк переживання і функціонування культури FLK+BLV на 3-4 доби, завдяки чому збільшувалась продукція антигену ВЛ і зростав його титр в 1,5-2 рази (табл. 3).

Таблиця 3 – Вплив ДМСО на продуктивні властивості культури клітин FLK-BLV

Термін культивування FLK-BLV, діб	Титр антигену вірусу лейкозу в РІД	
	Контрольні культури	Дослідні культури +ДМСО
5	1:1,5	1:2,0
7	1:2,0	1:3,6
9	1:2,2	1:4,0
11	-	1:4,5
13	-	1:4,6

Необхідним компонентом поживного середовища для культивування перещеплюваної лінії клітин FLK-BLV є сироватка крові тварин, яка виконує роль фізіологічного буферу, слугує джерелом поживних речовин, приймає участь у процесах адгезії, розшарування, росту та розмноження клітин і сприяє зв'язуванню та детоксикації пірогенів, токсинів, а також продуктів метаболізму клітин. Найбільш універсальною є сироватка крові плодів корови, але дефіцит та висока вартість не дозволяють її широко використовувати. Суттєвим недоліком сироваток дорослих тварин є наявність у них інгібіторів, здатних негативно впливати на репродукцію ВЛ ВРХ. Нами було розроблено технологію виготовлення аглобулінової сироватки крові ВРХ. Було встановлено, що за культивування лінії клітин FLK-BLV на поживних середовищах з використанням нативної сироватки крові ВРХ, вихід антигенів складав 255,0±7,7 см³ з 50 дм³ вірус-культуральної рідини з активністю в РІД 1:3,0-1:4,0, у той же час за використання аглобулінової сироватки отримували антигени в кількості 163,0±16,9 см³ з активністю 1:5,0-1:7,0. Таким чином, культивування перещеплюваної лінії клітин FLK-BLV з використанням аглобулінової сироватки крові ВРХ дозволяє отримувати антигени з більш високою активністю. Ці антигени також краще піддаються ліофілізації, утворюючи швидкорозчинну таблетку.

З метою дослідження динаміки реплікації ВЛ ВРХ і продукції вірусних антигенів у культурі клітин FLK-BLV було проведено електронну мікроскопію ВЛ за допомогою методу ультратонких зрізів культури клітин FLK+BLV через 6, 12, 24, 48, 96, 120 і 240 годин культивування. У цитоплазмі клітин знаходили вакуолі, заповнені віріонами різної стадії розвитку. Було встановлено, що зрілі віріони з'являються на 3-5 доби культивування. На 6-7 доби виявляли найбільшу кількість зрілих віріонів, які знаходились у міжклітинному просторі (рис. 1, 2). Накопичення антигену ВЛ також залежало від терміну культивування клітин FLK-BLV. Максимальна реплікація ВЛ і продукція його антигенів у культурі клітин FLK-BLV відбувалась у період активного ділення клітин. Після формування моношару (на 6-7 добу) наступала контактна інгібіція проліферації клітин. Клітини старіли, з'являлась груба зернистість цитоплазми, знижувалась їх життєздатність і функціональна активність. Зростання титру антигену ВЛ, виготовленого з вірус-культуральної рідини з 5-ї до 7-ї доби культивування було з 1:2 до 1:4 в РІД, подальше збільшення терміну культивування не підвищувало титр антигену.

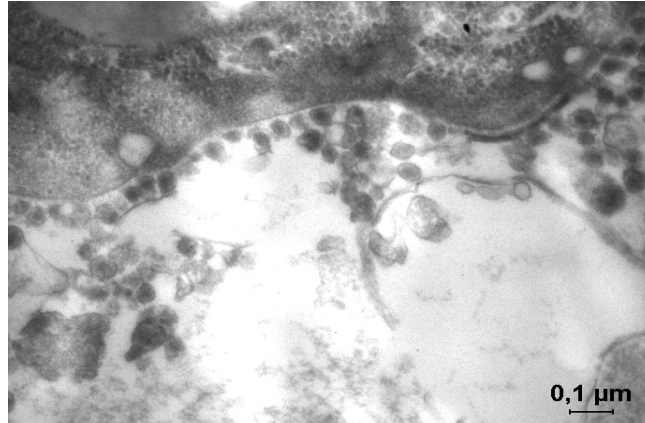


Рис. 1 Вакуолі з вірусними частинками різної стадії розвитку.

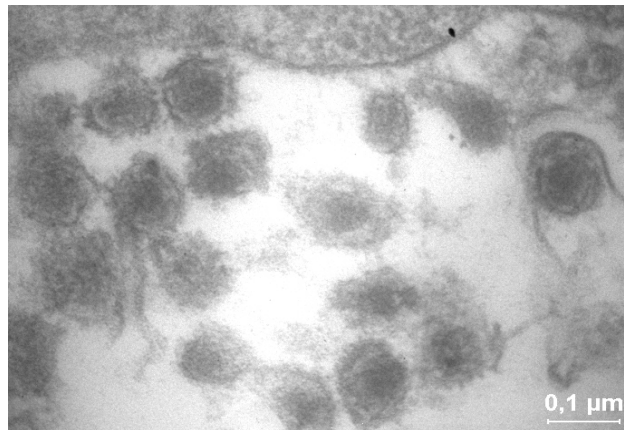


Рис. 2 Вірусні частинки в міжклітинному просторі на 7-му добу культивування FLK-BLV.

Удосконалену технологію буде впроваджено при виробництві «Наборів компонентів сухих та рідких для серологічної діагностики лейкозу ВРХ в РІД». Результати досліджень будуть враховані при розробці тест-системи ІФА для діагностики лейкозу ВРХ.

Висновки. 1. Удосконалено технологію виробництва антигену ВЛ ВРХ, яка дозволяє одержати більш активний та специфічний антиген ВЛ ВРХ, що відповідає сучасним стандартам.

2. Препарат «Актовегін» у дозі 1-2 мг/см³ покращує ростові властивості поживного середовища, підвищує проліферативну й антигенпродукуючу активність культури клітин FLK-BLV. Індекс проліферації (ІП) клітин складає 12,6±0,26 при 8,6±0,17 в контролі; титр антигену в РІД при цьому збільшується в 1,7 рази та становить 1:7 в порівнянні з 1:4 у контролі.

3. «Інсулін» у дозі 1 та 2 од./см³ поживного середовища посилює проліферацію клітин FLK-BLV, прискорює термін виповнення моношару та підвищує реплікацію вірусу та продукцію його антигенів. При цьому ІП становить 18,6±0,12, титр антигену ВЛ – 1:6,5; у порівнянні з контролем ІП становить 8,6±0,17.

4. Додавання 1 % ДМСО до поживного середовища підвищує термін переживання та функціонування культури FLK-BLV на 3-4 доби, завдяки чому продукція антигену ВЛ зростає в 1,5-2 рази.

5. Використання аглобулінової сироватки крові ВРХ підвищує репродукцію вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів у культурі клітин FLK-BLV. Вихід антигенів складає 163,0±16,9 см³ з 50 дм³ вірус-культуральної рідини з активністю в РІД 1:5,0-1:7,0.

6. За допомогою електронної мікроскопії встановлено, що максимальна реплікація ВЛ і продукція його антигенів у культурі клітин FLK-BLV відбувається в період активного ділення клітин з 5-ї до 7-ї доби культивування.

Список літератури

1. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [Text]. – Paris, 2004. – Vol. 2. – P. 464-485.
2. Вирусные болезни животных [Текст] / В. Н. Сюрин [и др.]. – М. : ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
3. Міжнародна валідація національного лейкозного стандарту. [Текст] / О. Ф. Блоцька [та ін.] // Вет. медицина України. – 2011. – № 3. – С. 13-16.
4. Блоцька, О. Ф. Гармонізація до міжнародних рекомендацій методів контролювання та оцінки показників якості діагностичних наборів для виявлення антитіл до вірусу лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії [Текст] / О. Ф. Блоцька // Наук.-техн. бюл. Ін-ту біології тварин і ДНДКІ вет. препаратів та кормових добавок. – Л., 2009. – Вип. 10, № 3 – С. 125-129.
5. Голубев, Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии [Текст] / Д. Б. Голубев, А. А. Сомина, М. Н. Медведева. – Л. : Медицина, 1976. – 224 с.
6. Машковский, М. Д. Лекарственные средства : пособие по фармакотерапии для врачей [Текст] / М. Д. Машковский. – 8-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина, 1977. – Ч. 1. – С. 557-563.

IMPROVEMENT OF THE TECHNOLOGY OF ANTIGEN FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BOVINE LEUKEMIA IN IMMUNODIFFUSION TEST PRODUCTION

Stegniy B.T., Fisenko S.A., Stegnyy M.Yu., Dunaev Yu.K., Konovalov A.V., Babanin N.I.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

Technology of production of cattle leukemia virus antigen, used for the manufacture of the “Kits of dry and liquid ingredients for the serological diagnosis of bovine leucosis in immunodiffusion test”, which is suitable for implementation in industrial scale, and allows you to get more active and specific BLV antigen, has been improved.