

Результати досліджень показали, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 2,0 %. За 24 години росту кількість молочнокислих та біфідобактерій збільшилась і склала $1,9-4,1 \times 10^6$ КУО/см³.

Висновки. Удосконалена технологія культивування виробничих штамів *L. plantarum* та *B. adolescentis*, *Streptococcus lactis* на різних ростових субстратах з додаванням аеросилу А-300. Встановлено, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 2,0 %. За 24 години росту кількість бактеріальних клітин збільшилась і склала $1,9-4,1 \times 10^6$ КУО/см³.

Список літератури

1. Банникова, Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности [Текст] / Л. А. Банникова // М.: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с. 2. Егоров, Н.С. Микроби антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности [Текст] / Н.С. Егоров. - М.: «Высшая школа», 1965. – 211 с. 3. Коваленко, Н. К. Биотехнология культивирования молочнокислых бактерий [Текст] / Н. К. Коваленко // Молочная промышленность. – 2002. – № 2. – С. 24-25. 4. Янковський, Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления [Текст] / Д. С. Янковський // К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с. 5. Ямборко, Г.В. Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* [Текст] / Ямборко Г.В., Соловйова І.Л. // Мікробіологія і біотехнологія.-2007. – № 1. – С. 53-59.

IMPROVEMENT OF CULTIVATION TECHNOLOGY OF PRODUCTION STRAINS *L. PLANTARUM* AND *B. ADOLESCENTIS*, *STREPTOCOCCUS LACTIS* ON DIFFERENT GROWTH SUBSTRATES

Guzhivins'ka S.O.

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

*Data concerning the improvement of cultivation technology of production strains *L. plantarum*, *B. adolescentis* and *Streptococcus lactis* on growth substrates with adding of aerosile A-300 that stimulates growth activity and production of biologically active substances of certain bacteria are presented in the article.*

УДК 636.09:578.824:57.083:311.42

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ ELISA ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНЕЙТРАЛІЗУЮЧИХ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ СКАЗУ

Дрожже Ж.М.

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

Серологічний контроль ефективності антирабійних вакцинацій у домашніх м'ясоїдних швидко розвинувся в останнє десятиріччя в зв'язку з масовим введенням карантинних обмежень у країнах вільних від сказу. Скандинавські країни, Великобританія, країни Євросоюзу та Японія запровадили систему, основу на вакцинації собак і котів з подальшим визначенням титру віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу перед ввезенням на територію країни [1-3]. Виявлення та визначення титру антитіл також є одним із головних елементів оцінки ефективності проведення кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних [4-7].

Методи дослідження антитіл до вірусу сказу значно удосконалились з моменту введення у вірусологічну практику реакції нейтралізації на білих мишах, що розроблена авторами методики Webster і Dawson ще в 1935 році [8, 9]. На заміну реакції нейтралізації на білих мишах для рутинної практики були запропоновані більш швидкі та дешеві варіанти реакції нейтралізації в культурі клітин – RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test), описаний Smith з колективом авторів в 1973 році та FAVN (fluorescent antibody virus neutralisation), описаний Cliquet з колективом авторів в 1998 році [8 - 10]. Ці методи залишаються референтними згідно вимог ВООЗ та МЕБ [8, 10].

Однак, з початку 80-х років минулого століття знаходить поширення ELISA метод визначення рівня антирабійних антитіл. Описано декілька імуноферментних тест-систем для визначення титру антитіл до вірусу сказу у сироватці крові людей, домашніх та диких м'ясоїдних [8, 9]. Перевага методу ELISA – його стандартність, швидкість та легкість у проведенні, а також відсутність необхідності використання живого вірусу сказу та культури клітин. Він також менш залежний від якості сироваток та проблем, пов'язаних із гемолізом, цитотоксичністю та бактерійною забрудненістю досліджуваних сироваток [9].

Основні характеристики методів дослідження антитіл до вірусу сказу подано у таблиці 1.

Таблиця 1 – Основні характеристики методів дослідження антирабійних віруснейтралізуючих антитіл

№ n/n	Показник	Метод		
		РН на білих мишах	РН в культурі клітин	ELISA
1	Час проведення, діб	14	3	0,2
2	Потреба у живому вірусі сказу	Так	Так	Ні
3	Потреба у спеціальному обладнанні	Ні	Так	Так
4	Вид тварин	Всі	Всі	Переважно м'ясоїдні
5	Вплив якості сироватки	Так	Так	Ні

Мета дослідження: валідація методу ELISA для визначення віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу тест-системою Platelia Rabies Kit II в сироватках крові тварин, визначення його діагностичної чутливості та специфічності, кореляції титрів та граничних значень рівня антитіл.

Матеріали та методи: 472 зразки сироватки крові від м'ясоїдних тварин, надісланих в ДНДІЛДВСЕ для визначення рівня антитіл та отримання міжнародного сертифікату для перетину кордонів європейських країн, згідно наказів та розпоряджень Державного комітету ветеринарної медицини для визначення ефективності антирабійних вакцин, після проведення кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних: 268 проб від собак, 98 проб від котів та 106 проб від лисиць.

Тест-система Platelia Rabies Kit II виробництва Bio-Rad, обладнання для проведення імуноферментного аналізу. Перещеплювала культури клітин нирки сирійського хом'яка – ВНК 21/13, тест-штам CVS вірусу сказу, позитивна та негативна референтна сироватка МЕБ до вірусу сказу, FITC-кон'югат (антирабійний моноклональний глобулін) виробництва FDI Diagnostics, Inc., інвертований люмінесцентний мікроскоп.

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунологічних препаратів

FAVN проводили, як описано в Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [8], ІФА – згідно з листівкою-вкладкою до тест-системи. Діагностичну чутливість та специфічність визначали за формулами:

$$\text{Діагностична чутливість} = \frac{II}{II + XH} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Діагностична специфічність} = \frac{IH}{IH + XI} \cdot 100\% \quad (2),$$

де ІП – істинно позитивні результати;
ІН – істинно негативні результати;
ХН – хибно негативні результати;
ХП – хибно позитивні результати [8].

Кореляцію значень титрів антирабічних антитіл визначали за допомогою комп'ютерної програми MS Excel. Мінімальний титр антитіл, який здатна виявити тест-система, визначали шляхом дослідження граничних розведень.

Результати досліджень. Зразки сироваток крові тварин попередньо протестовані в FAVN були поділені на 2 групи: 1 – негативні і з титром антитіл нижче 0,5 МО/см³, 2 – з титром вище 0,5 МО/см³ та дослідженні в ELISA. Результати дослідження наведено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Результати дослідження сироваток крові тварин методами FAVN та ELISA

		FAVN (референтний метод)	
		≥ 0,5 МО/см ³	< 0,5 МО/см ³
ELISA	Собаки		
	≥ 0,5 МО/см ³	171	3
	< 0,5 МО/см ³	9	85
	Коти		
	≥ 0,5 МО/см ³	68	3
	< 0,5 МО/см ³	2	25
	Лисиці		
	≥ 0,5 МО/см ³	31	3
< 0,5 МО/см ³	5	67	

Діагностична чутливість та специфічність ELISA у порівнянні з референтним методом FAVN для собак становила 98 і 90 %, котів – 96 і 93 % та лисиць – 91 і 93 % відповідно.

Встановлення кореляційної залежності між результатами титрів антирабічних віруснейтралізуючих антитіл визначеними методами FAVN та ELISA показана на рисунку.

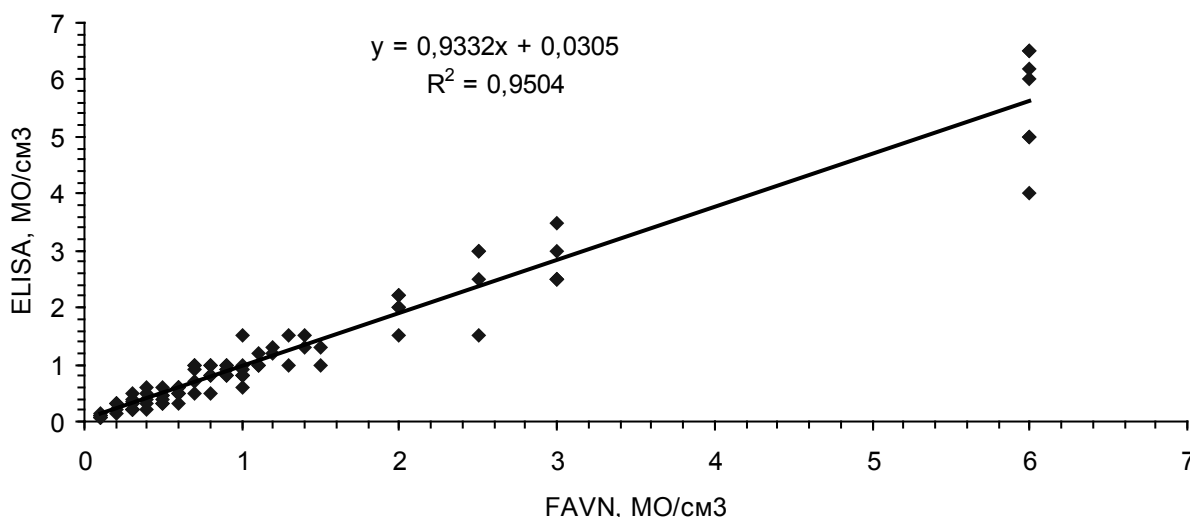


Рис. Кореляція між титрами антирабічних віруснейтралізуючих антитіл визначеними методами FAVN та ELISA (n=94)

Як видно з графіку, кореляція між результатами, отриманими при дослідженні сироваток крові собак, котів та лисиць методами FAVN та ELISA, становить 0,97.

При дослідженні методами граничних розведень встановлено, що мінімальний титр віруснейтралізуючих антитіл, що можна виявити методом FAVN, становить 0,024 МО/см³, а методом ELISA – 0,12 МО/см³.

Висновки.

1. Валідовані ELISA тест-системи – оптимальні діагностикуми для проведення масових досліджень сироваток крові м'ясоїдних на наявність віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу для оцінки ефективності проведення протиєпізоотичних заходів.

2. Діагностична чутливість і специфічність при дослідженні сироваток крові методом ELISA з використанням тест-системи Platelia Rabies Kit II становить для собак 98 і 90 %, котів 96 і 93 %, лисиць 91 і 93 %.

3. Кореляція між значеннями титрів віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові м'ясоїдних, досліджених методами FAVN та ELISA, становить 0,97.

Список літератури

1. Kennedy, J. Quarantine and Rabies: A Reappraisal. Report by the advisory group on Quarantine to the right hon nick brown MP, Minister of agriculture, fisheries and food. MAFF publication, London, 1998, p. 313. 2. Klingeborn B., Krogsrud J. Vaccination and antibody testing replacing quarantine as rabies safety measure for transfer of dogs and cats into Sweden and Norway from EU/EFTA-countries. Rabies Bull. Eur. 17 (4), 1993, p. 13. 3. EC Regulation № 998/2003 of the European parliament and of council of 26 may 2003 on the animal health requirements applicable to the non-commercial movements of pets animal. 4. Matouch O. and Vitasek J. Rabies situation and rabies control in the Czech Republic 2000-2002. Rabies Bulletin of Europe, 2002, 4:5-10. 5. Романенко, О.А., Дрожже Ж.М. Оцінка ефективності пероральної вакцинації проти сказу диких м'ясоїдних в Україні // Ветеринарна біотехнологія. – Київ. – 2008. – 13 (1). – С.346-352. 6. Cliquet, F., Aubert, M. Elimination of Terrestrial Rabies in Western European Countries//Control of Infectious Diseases by Vaccination. Dev Biol, Karger, 2004, vol. 119, pp 185-204. 7. The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, October 2002, European Commission, 55 p. 8. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines/ Office International epizootic (OIE),-2004. 9. Laboratory Techniques in Rabies/ WHO, Fourth Edition, -1996. 10. WHO Expert Consultation on Rabies: First Report, Geneva,-2004.

VALIDATION OF ELISA FOR DETERMINING OF RABIES VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY

Drozhzhe Zh.M.

State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv

The article presents results of validation of test-kit Platelia Rabies Kit II manufactured by Bio-Rad to detection rabies virus-neutralizing antibody titer in serum after vaccination of carnivorous by ELISA

УДК 619 615.371 / 372 : 616.986.7

РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОНСЕРВАЦИИ ЛЕПТОСПИР ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ БИОПРЕПАРАТОВ

*Зайцев В.В., Дремач Г.Э.**

УП «Витебская биофабрика»

**УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск*

Первую вакцину против лептоспироза предложили в 1916 году Wani, Ido, Hoki в Японии для профилактики заболевания у шахтеров. Первоначально это была суспензия печени зараженных лептоспирозом морских свинок, а затем – культура, выращенная на сывороточной среде и инактивированная формалином.

В СССР вакцину против лептоспироза животных из лептоспир серогрупп Помона и Гриппотифоза впервые применили в 1947 году. Она представляла собой смесь 2 культур, инактивированных формалином. В дальнейшем в ее состав ввели лептоспиры серогрупп Иктерогеморрагия и Каникола (1952-1956), Тарассови (1959-1962), Гебдомадиси и Ваталия (1965-1966).

В 1978 году в ветеринарную практику внедрили депонированную вакцину из штамма ВГНКИ, которая успешно применяется до настоящего времени. Однако эпизоотическая ситуация по лептоспирозу остается напряженной.

Перекрестный иммунитет между лептоспирами различных серогрупп, а в ряде случаев и сероваров, либо не создается, либо очень слабо выражен. Поэтому вакцина, которая могла бы быть эффективной против всех лептоспир, должна содержать большинство сероваров. Изготовление такой вакцины технически не осуществимо, поэтому в каждом отдельном случае целесообразно определить – вакцина какого состава необходима для животных данного вида в определенном регионе [1].

Проведенное изучение этиологической структуры болезни позволило с достаточным основанием включить в состав вакцины против лептоспироза свиней серовары лептоспир: *L. pomona*, *L. tarassovi* и *L. icterohaemorrhagia*.

Эпизоотические показатели свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования средств специфической профилактики лептоспироза животных. В порядке реализации этой задачи в 1990 году в России внедрили концентрированную, а в 1996 году – сухую вакцину. Однако концентрированная вакцина не получила практического применения из-за выпадения не разбивающегося осадка при длительном хранении [2, 3].

В связи с вышеизложенным, одним из ключевых моментов в разработке высокоэффективной вакцины против лептоспироза является подбор консерванта, который бы обеспечивал сохранение целостности бактериальных клеток и специфических антигенов в составе препарата в течение продолжительного периода его хранения.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 5 производственных штаммов лептоспир: *L. pomona*; *L. tarassovi*; *L. grippotyphosa*; *L. icterohaemorrhagia*; *L. canicola*.

Для культивирования лептоспир в опытах использовали следующие питательные среды: сывороточная среда (СС); сывороточная модифицированная среда с липополисахаридом сальмонелл (СМС-ЛПСС); сывороточная модифицированная среда с липополисахаридом эшерихий (СМС-ЛПСЭ). Штаммы лептоспир пересеивали каждые 15-20 дней.

Наличие роста определяли просмотром пробирок в проходящем свете микроскопа и микроскопией капель культур в темном поле микроскопа. Чистоту культур проверяли высевом на МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро, а также просмотром культур в проходящем свете и микроскопией.

Серогрупповую принадлежность штаммов лептоспир контролировали в перекрестной РМА с групповыми агглютинирующими лептоспирозными сыворотками согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике лептоспироза животных».

Концентрацию лептоспир определяли путем подсчета в счетной камере Петрова-Хауссера.

В исследованиях использовали животных: кроликов породы шиншилла массой 3,0-3,5 кг; золотистых хомячков массой 40-50 г; белых мышей массой 18-20 г; морских свинок массой 120-150 г; морских свинок массой 350-400 г.

Для оценки антигенной и иммуногенной активности лептоспир, культуры выращенные на средах разного состава, консервировали следующими веществами: способ 1 – формалином 0,3 %; способ 2 – формалином 0,2 % и 0,01 % натрия мертиолятом; способ 3 – фенолом 0,3 %; способ 4 – фенолом 0,5 %; способ 5 – теотропином 0,1 %; способ 6-0,02 % натрия мертиолятом; способ 7 – формалином 0,3 и до 5 % глюкозой; способ 8 – формалином 0,2 %, 0,01 % натрия мертиолятом и 5 % глюкозой; способ 9 – формалином 0,3 % и 5 % натрия тиосульфата; способ 10 – фенолом 0,5 % и 5 % натрия тиосульфата.

Смесь лептоспир и консерванта инкубировали при температуре 37 °С и 28 °С в течение 48 часов. Консервированные разными способами лептоспиры далее концентрировали в 2 раза и учитывали в дальнейшем наличие клеток в гущенной культуре.