

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

Таблиця 2 – из качества референс-вакцины (сер.1-06) в процессе хранения

Дата титрования	Обратная величина 50 % конечного разведения референс-вакцины, ЭД	Иммуногенная активность, МЕ/см ³	Timp CVS, ЛД ₅₀ /0,03 см ³
Декабрь, 2008 г.	2,63	1,8	2,8
Среднее за 2010 г.	2,71±0,1	1,8	2,35±0,22

Полученные результаты показали, что отечественная референс-вакцина позволяет объективно оценивать иммуногенную потенцию антирабических вакцин в международных единицах.

Национальный стандарт является обязательным препаратом, используемым при контроле иммуногенности каждой серии антирабической вакцины, выпускаемой предприятиями-изготовителями в Российской Федерации, а также в НИИ при проведении сертификационных и других испытаний.

CREATION OF THE NATIONAL BRANCH STANDARD OF IMMUNOGENICITY OF RABIES VACCINES

Puhova N.M.¹, Samuylenko A.Ya.¹, Ivanov I.V.¹, Yeremets N.K.¹, Yeremets V.I.¹, Elakov A.L.², Pestova G.V.³

¹All-Russian Scientific Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo, Russian Federation,

²All-Russian State Center of Quality and Standardization of Drugs for Animals and Feeds,

³FSUP "Schelkovskiy Biocombine"

The national branch standard which allow to estimate objectively an immunogenic potency of all rabies vaccines which are let out in Russia, by means of unified method NIH that promotes quality maintenance of let out production.

УДК 619:616.988:578.74

ОТРИМАННЯ АНТИГЕНІВ РЕОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ПТИЦІ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ НЕПРЯМОГО ВАРІАНТУ ІФА

Рябінін С. В., Терещенко О. В., Шомін О. А.

Інститут птахівництва НААН

Для успішної боротьби з реовірусною інфекцією необхідна швидка і якісна діагностика, а також засоби профілактики. Для ретроспективної діагностики реовірусної інфекції використовують реакцію нейтралізації (РН), реакцію дифузної преципітації (РДП) та імуноферментний аналіз (ІФА) [1, 5, 6, 7, 9]. Перевагами ІФА – є висока чутливість та специфічність, що досягається ступенем очищення та концентрування антигену, який використовується в постановці реакції [3, 4, 8].

Метою наших досліджень було отримання концентрованого та високоспецифічного антигену реовірусу птиці, придатного для розробки вітчизняної діагностичної тест – системи на основі непрямого варіанту ІФА.

Матеріали і методи досліджень. В дослідженнях були використані патогенні штами реовірусу: штам «1733», який був виділений Rosenberger [9] у 1983 році в Нідерландах від хворих курчат, та місцевий штам Br – 06 виділений в ІП НААН від курчат-бройлерів у 2006 році, та ідентифікований ВНДІЗТ (м. Володимир). Штами депоновані в ДНКІБШМ (м. Київ) в липні 2008 року і зберігаються у відділі профілактики хвороб птиці ІП НААН у ліофільно висушеному стані за температури -20° С. Вірусотримуючий матеріал – культуральна розплідка штамів з титром вірусу 6,0-6,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Мікроскопію вірусу проводили електронним мікроскопом ПЭМ-125К при прискорюючому напруженні 75 kV, що має в своєму складі систему зйомки та аналізу зображення САІ – 01А на основі CCD камери DX – 2 в Інституті проблем кріобіології та кріомедицини (м. Харків).

Електронна мікроскопія здійснювалася методом негативного контрастування [2].

Результати досліджень. З метою звільнення від клітинного дебрису вірус заморожували на стінках ролерних флаконів за температури -20° С з наступним відтаюванням до 4° С, тричі. Надалі його інактивували етиленіміном у концентрації 0,1 % протягом 24 годин за температури 37,5° С.

Подальше очищення та концентрування проводили за двома методиками:

Перша методика. Попереднє очищення проводилося з використанням хлороформу (20 % від загального об'єму) та низькошвидкісного центрифугування (2000g 15-20 хвилин). Далі супернатант обробляли 7 % поліетиленгліколем (ПЕГ 6000), осад збирали центрифугуванням та ресуспензували в TSE – буфері.

На завершальному етапі вірус осаджували через розчин 30 % – ї сахарози при 70000g на ультрацентрифузі протягом 3 годин, отриманий осад ресуспензували в TSE – буфері.

Друга методика відрізнялася від першої тим, що на етапі попереднього очищення використовували обробку вірусвміщуючого матеріалу 7 % поліетиленгліколем (ПЕГ 6000) після чого матеріал обробляли ультразвуком (22 кГц). Завершальний етап очищення вірусу не відрізнявся від першої методики.

Однорідність і чистоту вірусу контролювали під електронним мікроскопом (рис. 1).

Отримані антигени сенсibiliзували на планшети у концентрації 0,02-0,05 мг/мл та проводили непрямий варіант ІФА з позитивними референтними сироватками титр яких становив не менше 1:3200, що вказує на достатню активність антигену. У специфічних гетерологічних сироватках, що входять до складу комерційних наборів фірми BioChek та «Сінко» ВНДІЗТ (для визначення антитіл до інфекційного бронхіту курей, синдрому зниження несучості, мікоплазми, ньюкаслської хвороби, хвороби Гамборо) не виявлено позитивних та сумнівних титрів до реовірусної інфекції, що вказує на специфічність отриманих антигенів по відношенню до гомологічних антитіл.

Оцінка стабільності антигенів, очищених двома методами, при зберіганні на планшетах, показала різні результати. Перевірку проводили через кожні 7 днів протягом 10 тижнів в умовах штучного старіння при 37° С. Активність реовірусного антигену, очищеного та концентрованого з використанням ультразвуку, протягом досліджуваного періоду не знижувалася. При використанні в якості антигену для сенсibiliзації планшетів препарату отриманого очищенням хлороформом, вже після 4-го тижня зберігання спостерігалось значне зниження активності в ІФА (рис. 2).

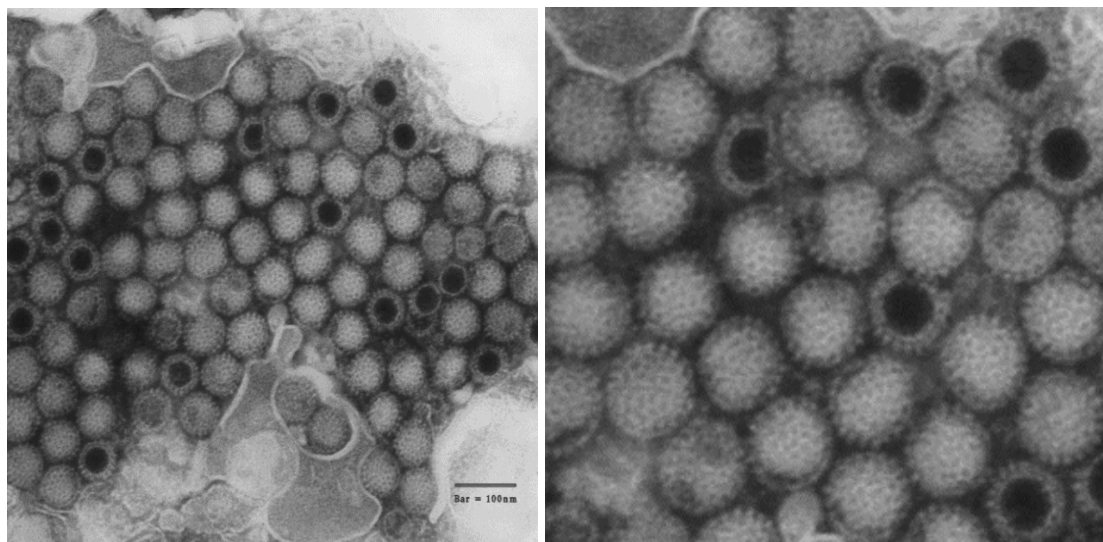


Рис. 1 Електронна мікроскопія реовірусу.

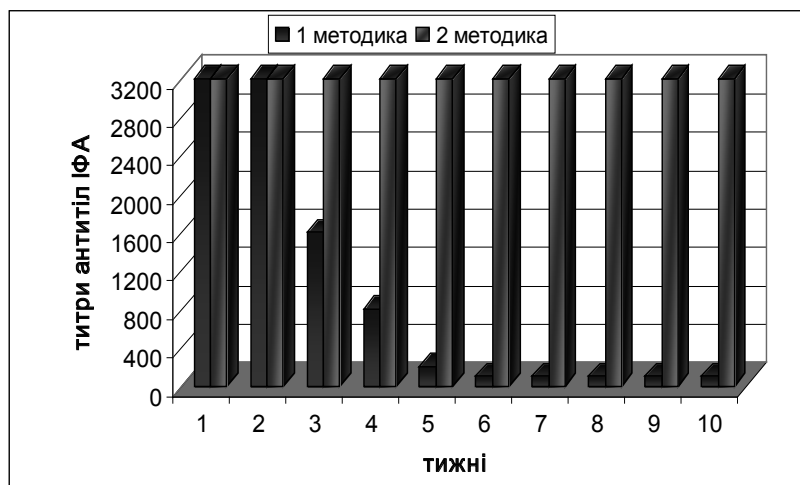


Рис. 2 Стабільність антигенів, очищених двома методами, при зберіганні на планшетах.

Отримані результати свідчать про те, що при конструюванні ІФА-діагностикуму слід використовувати методику очищення антигену реовірусу птиці з використанням ультразвуку (друга методика).

Висновок. При очищенні антигену реовірусної інфекції птиці з використання ультразвуку було отримано високостабільний препарат концентрованого антигену, придатний для конструювання набору ІФА з метою виявлення антитіл до збудника реовірусної інфекції птиці у сироватках крові курей.

Список літератури

1. Гусев, А.А. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных иммуноферментным методом: методические указания / А.А. Гусев, А.Н. Панин / ФГУ ВНИИЗЖ. – Владимир. – 1998. – С. 53-57.
2. Королев, М.Б. Электронно-микроскопические методы выявления вирусов / М.Б. Королев. – Итоги науки и техники, 1980. – С. 114-157. – (Вирусология, т. 9).
3. Методические указания по выявлению антител к возбудителю реовирусной инфекции птиц в сыворотках крови кур методом одного разведения в непрямой реакции иммуноферментного анализа / [Куприянов А.И., Мудрак Н.С., Дрыгин В. В., Старов С. К.]. – ФГУ ВНИИЗЖ. – Владимир. – 2008. – С. 88-94.
4. Методические указания по выявлению антигена реовируса птиц в непрямом жидкофазном блокирующем варианте иммуноферментного анализа / [Куприянов А.И., Мудрак Н.С., Дрыгин В.В., и др.] – ФГУ ВНИИЗЖ. – Владимир. – 2008. – С. 95-102.
5. Сюрин, В.Н. Реовирусная инфекция кур/ Сюрин В.Н. Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. – Москва: Вирусные болезни животных, 1998. – С. 17-20.
6. Теория и практика иммуноферментного анализа. [Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.]. – Москва «Высшая школа» - 1991. – С. 77-83.
7. Erriguez, C. Rearreglo genetico en reovirus aviares. /C.Erriguez,G.Wilcox – Avian Pathol. – 1990.V.19. – P. 477-487.
8. Hung, J.L. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. / Hung J.L., Liam C.K., Ming H.L.; Journal of Virological Methods. – 2002. – P. 129-138.
9. Rosenberger, J.K. Вирусный артрит. / Rosenberger J.K., Olson N.O. – Кн. под ред. Кэлнека Б.У., – М., – 2003. – С. 819-828.

OBTAINING OF THE ANTIGENS OF AVIAN REOVIRUS INFECTION FOR CONDUCTING OF INDIRECT ELISA

Ryabinin S.V., Tereshchenko O.V., Shomin O.A.

Poultry Research Institute of the NAANU

It has been tested two methods of purification and concentration of the antigen of the avian reovirus infection. The first method is the treatment of virus containing material by chloroform, polyethyleneglycole (PEG 6000) and ultra centrifugation. The second method is the treatment of the material by polyethyleneglycole (PEG 6000), ultrasound and ultracentrifugation. It has been carried out the comparative analyze of purified antigens under their sensitizing on their planchettes. The stable antigen was obtained when using the second method with ultrasound application.