

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

/ А.Б. Юркевич [и др.] // Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам: материалы Международной научно-практической конференции 27-28 мая 2003г. – Минск, 2003. – С. 101-104. 4. Электрохимическая активация: очистка воды и получение полезных растворов / В.М. Бахир [и др.] – М.: ВНИИИМТ, 2001. – 176 с.

DEFINITION OF ANTIVIRAL PROPERTIES OF ANOLYTE NEUTRAL SOLUTION IN VITRO

Konotop D.S.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine,

Babak V.A., Puntus I.A.

RUP "Institute of Experimental Veterinary Science named after S.N. Vysheslesky", Minsk, Belarus

The features of anolyte neutral solution on some viruses in cell culture are investigated. The received results of researches confirm antiviral activity of anolyte neutral solution.

УДК 619:578.834.1:636.2:616-076

РЕЗУЛЬТАТИ КОМІСІЙНОГО ВИПРОБУВАННЯ НАБОРУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ КОРОНАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В РЕАКЦІЇ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

Кучерявенко В.В., Кучерявенко Р.О.

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

Напненко О.О.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Коронавірусна інфекція великої рогатої худоби (ВРХ) – гостро перебігаюче, висококонтагіозне вірусне захворювання молодняка ВРХ, яке характеризується профузним проносом, дегідратацією організму, розвитком катарального або катарально-геморагічного ентероколіту, виснаженням та високою летальністю. Україна є стаціонарно неблагополучною державою щодо коронавірусної інфекції великої рогатої худоби, тому успішна боротьба з цією інфекцією досягається завдяки своєчасній лабораторній діагностиці [1, 2].

Реакція імунофлуоресценції (РІФ) визнана високочутливою, специфічною та експресною реакцією для діагностики багатьох вірусних захворювань. РІФ дозволяє в короткий термін отримувати точний результат щодо наявності або відсутності коронавірусу в клінічному або патологічному матеріалі [3, 4]. У лабораторії вірусології ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» вперше в Україні розроблено набір для діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби в реакції імунофлуоресценції.

Згідно з наказом № 50 від 09.07.2010 р. директора Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів проведені міжвідомчі комісійні випробування „Набору для діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби в реакції імунофлуоресценції”. У проведенні досліджень крім авторів даної статті приймали участь: директор державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, доктор ветеринарних наук Ушкалов В.О. (голова комісії); в. о. начальника головного управління ветеринарної медицини в Харківській області Головачов В.Ф.

Матеріали та методи. Випробування проводили згідно з затвердженою програмою за наступними показниками: зовнішній вигляд, колір; наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів; щільність укупорки флаконів; наявність вакууму у флаконах; масова частка вологи; розчинність; стерильність; активність та специфічність. Для чого використовували: мікроскоп люмінесцентний; термостат з температурою підігріву 37 °С; холодильник побутовий; предметні знежирені скельця; накривні скельця; піпетки мірні на 1, 2, 5, 10 см³; колби мірні; фільтрувальний папір; ацетон хч; 0,2 М розчин фосфатно-буферний (рН 7,2-7,4); специфічний флуоресціюючий імуноглобулін до коронавірусу ВРХ; позитивну та негативну до коронавірусу сироватки; розчин синьки Еванса; препарати з культурою клітин трахеї теляти (ТрТ), котра була інфікована коронавірусом, вірусом інфекційного ринотрахеїту (ІРТ), вірусної діареї (ВД), парагрипу-3 (ПГ-3) та препарати з не інфікованою культурою клітин.

Проведення досліджень та результати.

1. Визначення зовнішнього вигляду, кольору. Визначення зовнішнього вигляду та кольору проводили візуально в пронизуючому світлі відповідно до ТУ У 24.4-00497087-106:2010.

Результат: Специфічний флуоресціюючий імуноглобулін до коронавірусу ВРХ мав вигляд сухої, гомогенної, аморфної маси жовтогарячого кольору. Позитивна та негативна до коронавірусу ВРХ сироватки мали вигляд сухої, гомогенної, аморфної маси сіро-жовтого кольору. Синька Еванса мала вигляд рідини синього кольору.

2. Наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів.

Визначення сторонніх домішок та тріщин флаконів проводили візуально в пронизуючому світлі. Сторонні домішки та тріщини флаконів згідно з ТУ У 24.4-00497087-106:2010 повинні бути відсутні.

Результат: Сторонні домішки та тріщини флаконів відсутні.

3. Визначення щільності укупорки флаконів.

Щільність укупорки визначали шляхом прокручування ковпачка. Укупорка повинна бути щільною.

Результат: Укупорка щільна.

4. Наявність вакууму у флаконах.

Наявність вакууму у флаконах визначали за допомогою апарату типу Д'Арсенваль.

Результат: спостерігали яскраве фіолетове світіння, що свідчило про наявність вакууму у флаконах.

5. Визначення масової частки вологи.

Масову частку вологи визначали відповідно до ГОСТ 24061-89.

Результат: Масова частка вологи складала 3,0 %.

6. Визначення розчинності.

Розчинність визначали шляхом додавання дистильованої води в об'ємі, що відповідає об'єму препаратів до висушування (1,0 см³).

Результат: Вміст флаконів повністю розчинявся.

7. Визначення стерильності.

Визначення контамінації бактеріальною і грибовою мікрофлорою проводили відповідно до ДСТУ 4483–2005. Розчин синьки Еванса за цим показником не тестується.

Результат: Специфічний флуоресціюючий імуноглобулін до коронавірусу ВРХ, позитивна та негативна до коронавірусу ВРХ сироватки були стерильними.

8. Визначення активності та специфічності.

Активність флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ визначали за фарбуючим титром. З цією метою культуру клітин ТрТ вирощували у пробірках з накривними скельцями, частину котрих інфікували коронавірусом ВРХ, а частину залишали в якості контролю. Інфікування проводили коронавірусом, штам «ВС-1», з інфекційною активністю $5,0-5,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$. Через 48 годин після зараження скло з культурою клітин виймали, промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), висушували на повітрі та фіксували в охолодженому ацетоні впродовж 25 хвилин, а потім фарбували прямим методом РІФ за загальноприйнятою методикою з використанням дворазових розведень специфічного флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ від 1:2 до 1:32. Краплю кожного розведення імуноглобуліну наносили на заражені та контрольні препарати культури клітин. Препарати інкубували у вологій камері впродовж 30 хвилин за температури $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$, а потім промивали дистильованою водою і відмивали двічі по 10 хвилин у ЗФР, до другої зміни якого додавали фарбу синю Еванса з розрахунку $0,1 \text{ см}^3 0,1 \% \text{ фарби}$ на 400 см^3 забуференого фізіологічного розчину для гасіння неспецифічної люмінесценції та контрастування препарату. Після цього мазки висушували на повітрі. Люмінесцентну мікроскопію виконували при збільшенні об'єктиву $\times 40$ та окуляру $\times 10$.

Результат: В інфікованих коронавірусом клітинах спостерігали яскраве світіння цитоплазми. В міру збільшення розведення флуоресціюючого імуноглобуліну яскравість світіння зменшувалась. Фарбуючим титром специфічного флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ вважали його останнє розведення, яке забезпечувало специфічне світіння інфікованих клітин і відсутність світіння клітин контрольних культур, а робочим розведенням імуноглобуліну – вважали розведення на порядок нижче ніж фарбуючий титр. Так, фарбуючий титр люмінесціюючого імуноглобуліну становив 1:16, а робоче розведення 1:8.

Специфічність флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ визначали шляхом фарбування накривних скельць з культурою клітин ТрТ, інфікованих вірусами ІРТ, ВД та ПГ-3 за методикою, вказаною вище. В інфікованих вірусом ІРТ, ВД та ПГ-3 клітинах специфічне світіння було відсутнє.

Активність та специфічність позитивної сироватки до коронавірусу ВРХ визначали в реакції гасіння імунофлуоресценції. Для цього на відомий позитивний матеріал (скельця з інфікованою коронавірусом культурою клітин) наносили позитивну сироватку до коронавірусу ВРХ, витримували у вологій камері впродовж 30 хвилин, а потім обробляли специфічним флуоресціюючим імуноглобуліном до коронавірусу ВРХ (як наведено вище).

Результат: Не спостерігалась специфічна флуоресценція, цитоплазма клітин мала темно-коричневе забарвлення на фоні ледь помітної архітектоники клітин.

Активність та специфічність негативної сироватки до коронавірусу ВРХ визначали шляхом обробки позитивних препаратів (інфікованих коронавірусом культур клітин, як наведено вище) негативною сироваткою, а потім специфічним флуоресціюючим імуноглобуліном до коронавірусу ВРХ.

Результат: Специфічне флуоресціююче світіння зберігалось.

В якості контролю проводили обробку препаратів клітин, котрі були не заражені вірусним матеріалом.

Скельця з культурою клітин, які не заражені вірусним матеріалом (коронавірусом ВРХ), фарбували специфічним флуоресціюючим імуноглобуліном до коронавірусу ВРХ (як наведено вище).

Результат: Світіння було відсутнє, за наявності помітної архітектоники клітин культури.

Висновки.

1. Компоненти набору для діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби в реакції імунофлуоресценції, відповідають вимогам ТУ У 24.4-00497087-106:2010.

2. Розроблений у лабораторії вірусології ННЦ «ІЕКВМ» набір для діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби в реакції імунофлуоресценції специфічний, активний і дозволяє проводити лабораторну експрес-діагностику вище зазначеного захворювання.

Список літератури

1. Карпуть, А.М. Диагностика, профилактика и лечение желудочно-кишечных болезней телят [Текст]: Рекомендации / А.М. Карпуть, Ю.Г. Зелютков, Г.Ф. Макаревич – Горки: Витебский ветеринарный институт, 1993. – 48 с. 2. <http://www.en.wikipedia.org/wiki/Coronavirus>.
3. Бусыгин, К.Ф. Люминисцентная диагностика инфекционных болезней животных [Текст] / К.Ф. Бусыгин. – М.: Колос, 1975. – 158 с.
4. Закстельская, Л.Я. Коронавирусы человека и животных [Текст] / Л.Я. Закстельская, А.В. Шеболдов. – М.: Медицина, 1977. – 224.

RESULTS OF COMMISSION TEST OF IMMUNOFLUORESCENCE KIT FOR BOVINE CORONAVIRUS INFECTION

Kucheryavenko V.V., Kucheryavenko R.O.

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

Напненко О.О.

Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Results of commission test of immunofluorescence kit for bovine coronavirus infection are represented in the article. Specificity and activity of test kit's components are proved. This kit will be used for coronavirus infection diagnostics.