

A.A. Vorobjev. – Ufa, Russia, 1996. – 30 p. 3. Воробьев, А.А. Непарентеральные вакцины: принципы конструирования и эффективность [Текст] / А.А. Воробьев // ЖМЭИ. – 1998. – № 1. – С. 97–100. 4. Чумаков, М.П. [и др.] // Материалы 4 сессии Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1961. – С. 12–26. 5. Медуницын, Н.В. Вакцинология [Текст] / Н.В. Медуницын. – М. : Трида-Х, 1999. – 272 с. 6. Immunogenicity of a recombinant strain of vaccinia virus, expressing a Venezuelan equine encephalomyelitis virus structural protein gene in peroral immunization [Text] / V.A. Sviatchenko [at al.] // Vopr. Virusol. – 2000. – Vol. 45, № 6. – P. 38–41. 7. Воробьев, А.А. Микробиология и иммунология [Текст] / А.А. Воробьев. – М. : Медицина, 1999. – 464 с. 8. Воробьев, А.А. Современные направления в разработке новых иммунобиологических препаратов [Текст] / А.А. Воробьев // ЖМЭИ. – 1999. – № 5. – С. 16–21. 9. Adjuvanticity of pGPL-M and LRS in the immune responses of monkeys to oral immunization with diphtheria and tetanus toxoids [Text] / H. Mirchamsy [at al.] // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 20(1). – P. 13–20. 10. Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral vaccination with liposomes coated with filamentous hemagglutinin and pertussis toxoid [Text] / C.A. Guzman [at al.] // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61, № 2. – P. 573–579. 11. Atypical behaviour and survival of *Streptococcus pyogenes* L forms during intra-peritoneal infection in rats [Text] / L. Michailova [at al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 28(1). – P. 55–65. 12. The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin binding proteins (PBPs) in pathogenicity [Text] / M. Banai [at al.] // Vet. Microbiol. – 2002. – Vol. 90, № 1–4. – P. 263–279. 13. Guan, J. Retrospective study on the risk factors in patients with nosocomial bacterial L-form infection [Text] / J. Guan, Y. Sun, D. Zhu // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 1998. – №19(6). – P. 339–342. 14. Relation between *helicobacter pylori* L-form infection and tumor angiogenesis in human esophageal carcinoma [Text] / D.H. Yu [at al.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2003. – №25 (1). – P. 51–54. 15. Induction of hypersensitivity to endotoxin in C3H/HeJ mice by immunization with L-form *Salmonella typhimurium* [Text] / A. Nakano [at al.] // Immunol. Lett. – 1993. – Vol. 39, № 1. – P. 77–82. 16. Wang, H. Observations of properties of the L-form of *M. tuberculosis* induced by the antituberculosis drugs [Text] / H. Wang, Z. Chen // Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. – 2001. – № 24(1). – P. 52–55. 17. Conversion of *Salmonella typhimurium* to L-forms contributes to the maintenance of acquired immunity against murine typhoid [Text] / E. Kita [at al.] // Immunology. – 1995. – Vol. 86. – № 2. – P. 206–211. 18. Innes, C.M. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria [Text] / C.M. Innes, E.J. Allan // J. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 90, № 3. – P. 301–308.

## ASPECTS OF THE DEVELOPMENT AND CONSTRUCTION THE NEW GENERATIONS VACCINE PREPARATIONS FOR HUMANE AND VETERINARY MEDICINE

Volyanskiy A. Yu.

SE «Institute of Microbiology and Immunology the name of I.I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

Were presents the methodological and methodical approaches to the development and design of new generations of vaccine preparations for human and veterinary medicine. The author determined the prospect of immunological products using chemical and biological modifiers.

УДК 619:579.842.14:57.083.33

## ВИБІР СПОСОБУ ОЧИЩЕННЯ АНТИГЕНУ БАКТЕРІЇ *SALMONELLA ENTERITIDIS* ДЛЯ НЕПРЯМОГО ВАРІАНТУ ІФА

Драгуть С.С., Стегній Б.Т.

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

Сальмонельоз – зооантропонозне захворювання, яке викликають бактерії роду *Salmonella*, має велике епідеміологічне значення як чинник харчових токсикоінфекцій у людей та відіграє значну епізоотологічну роль, спричиняючи у тварин, птиці моно- або асоціативні інфекції з різним клінічним проявом. Основним резервуаром збудника сальмонельозу є птиця, зокрема кури. Провідна роль в етіології сальмонельозу курей понад 25 останніх років належить серовару *Salmonella Enteritidis*.

У більшості розвинутих країн розробляються програми заходів, спрямовані насамперед на профілактику сальмонельозів, які включають обов'язкове проведення моніторингових досліджень щодо сальмонельозу птиці. Для цього МЕБ рекомендує використовувати серологічні тести [1]. Оптимальним методом для серологічного моніторингу є високочутливий та специфічний метод ІФА, який дозволяє піддавати дослідженню велику кількість зразків сироваток крові впродовж робочого часу [2].

Відомо, що ліпополісахаридний антиген є найбільш специфічним компонентом бактеріальної клітини та його активність і специфічність залежать від способу одержання [3].

Тому метою нашої роботи був підбір способу виготовлення очищеного антигену, зокрема цієї фракції бактерії *Salmonella Enteritidis* (SE) для непрямого варіанту ІФА.

**Матеріали та методи досліджень.** У роботі був використаний виробничий штам *M. Salmonella Enteritidis*, який зберігається в депозитарії ДНКІБШМ.

Бактерії вирощували на МПА за температури 37 °С. Змиви добових культур сальмонел з агару робили стерильним 0,85 % фізіологічним розчином. Клітини бактерій відмивали центрифугуванням за 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Супернатант видаляли, а клітини осадку ресуспендували до концентрації 20 млрд. МК/см<sup>3</sup> за стандартом мутності. Бактеріальну суспензію прогрівали на водяній бані до температури 65 °С, додавали рівний об'єм 90 % фенолу і з постійним перемішуванням суміш інкубували за цієї температури впродовж 5 хвилин. Виготовлену рідину охолоджували до 0 °С та витримували в цьому режимі 30 хвилин. Після центрифугування охолодженої суспензії за 4000 g протягом 40 хв верхній шар обережно відбирали піпеткою й діалізували проти 100 об'ємів дистильованої води протягом 48 годин. Отриманий матеріал (II) порівнювали з матеріалом (I), який включав етапи культивування сальмонел в МПБ (за температури 37 °С); інактивації добової культури (1 % формаліном протягом доби за температури 37 °С); обробку детергентом ДСН у співвідношенні 1 мг/мг білка та діаліз проти ФБР, рН (7,3±0,1) з додаванням 0,01 % ЕДТА впродовж 48 годин за температури 4 °С.

Активність отриманих зразків антигенів з гомологічною сироваткою визначали у твердофазному ІФА. Для сенсibiлізації планшетів (96-лункових для імунологічних досліджень виробництва «Нунс», Данія) на КББ (рН 9,6) робили розведення антигенів від 1:100 до 1:1000 і вносили по 0,1 см<sup>3</sup> у лунки. Планшети з імобілізованим антигеном інкубували протягом 16–18 годин за температури 4 °С. В якості блокуючого розчину використовували 1 % БСА (бичачий сироватковий альбумін).

Сальмонельозні сироватки від імунованих курей (35 зразків), які надійшли з сектору мікоплазмозів і сальмонельозів, а також нормальну сироватку від інтактних курей розтитровували двократно з початкового їх розведення 1:100. Як детекторні антитіла був використаний антивидовий імунопероксидазний кон'югат проти IgG курей (НДІЕМ ім. Н.Ф. Гамалеї). Субстрат – ОФД (ортофенілєндіамін); стоп-реактив – 1 М сірчана кислота. Облік реакції здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Magellan» та рідера «Sunrise» при λ=492 нм. Титром сироватки вважали останнє її розведення, в якому середнє значення оптичної щільності не менше, ніж у два рази перевищувало цей показник негативної сироватки, тобто за S/P-співвідношенням, не меншим за 2.

Контроль специфічності ЛПС-АГ проводили щодо відсутності позитивної реакції ІФА (з використанням аналогічного антикропляючого кон'югату) з гетерологічними сироватками кролів, що містять антитіла до грампозитивної *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, грамнегативної спільнородинової (*Enterobacteriaceae*) *Escherichia Coli*, а також видової, зі спільним з SE соматичним антигеном (1; 9) однієї серогрупи *D. Salmonella Pullorum-Gallinarum*.

**Результати досліджень.** Отримані вищезазначеними способами експериментальні зразки антигенів перевіряли щодо активності в ІФА методом послідовних розведень позитивної сироватки. У таблиці 1 показані результати цих досліджень.

**Таблиця 1** – Активність експериментальних зразків антигенів SE (I, II) з гомологічними сироватками курей в ІФА

Розведення сироваток	I			II		
	Екстинкції оптичної щільності		S/P-співвідношення	Екстинкції оптичної щільності		S/P-співвідношення
	позитив.	негат.		позитив.	негат.	
1:100	0,573	0,186	3,08	1,443	0,194	7,44
1:200	0,424	0,153	2,77	1,075	0,190	5,66
1:400	0,392	0,129	3,04	0,841	0,117	7,19
1:800	0,246	0,115	2,14	0,617	0,129	4,78
1:1600	0,162	0,084	1,93	0,753	0,107	7,04
1:3200	0,142	0,078	1,82	0,282	0,083	3,40
1:6400	0,118	0,078	1,51	0,201	0,076	2,65
1:12800	0,063	0,061	1,03	0,076	0,068	1,12

Титр сальмонельозної сироватки курей значно відрізнявся при використанні обох антигенів. З першим зразком він складав 1:800, з другим зразком антигену цей показник становив 1:6400. Надалі працювали з антигеном (ЛПС-АГ), отриманим за методикою II, який проявив більш високу активність. Дослідженням сироваток крові курей щодо наявності специфічних антитіл був встановлений позитивний результат у всіх 35 зразках. При цьому розбіг мінімального та максимального їх титру знаходився в межах від 1:400 до 1:12800 і вище. Кількісний склад сироваток з певними титрами становив: 1:400 та 1:1600 – по 5,7 %; 1:800 та 1:3200 – по 2,9 %; 1:6400 – 54,3 %; 1:12800 і вище – 28,5 %.

За контролювання специфічності взаємодії ЛПС-АГ SE було показано, що його активність з гетерологічними кролячими сироватками (що містять антитіла до грампозитивної *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* (*M. av. ssp. paratuberculosis*), грамнегативної спільнородиною *Escherichia coli*, а також видової, із спільним зі *Salmonella Enteritidis* соматичним антигеном (1; 9) одної серогрупи D. *Salmonella Pullorum-Gallinarum*) не перевищувала 1:100 (табл. 2).

**Таблиця 2** – Активність ЛПС-АГ SE з гомологічними сироватками курей та гетерологічними сироватками кролів в ІФА

Розведення сироваток	Екстинкції оптичної щільності				
	Нормальна	SE	<i>Es. coli</i>	<i>S. Pullorum-Gallinarum</i>	<i>M. av. ssp. paratuberculosis</i>
1:100	0,212	1,671	0,428	0,440	0,375
1:200	0,183	1,088	0,286	0,287	0,267
1:400	0,164	0,825	0,236	0,216	0,235
1:800	0,149	0,611	0,191	0,175	0,210
1:1600	0,169	0,618	0,199	0,158	0,200

Наведені дані свідчать про специфічність зразку ЛПС-АГ, одержаного обробкою 90 % фенолом. У наступній таблиці 3 узагальнені результати щодо його активності з гомологічними курячими та гетерологічними кролячими сироватками в ІФА.

**Таблиця 3** – Узагальнені дані щодо активності ЛПС-АГ SE з гомо- та гетерологічними сироватками в ІФА

Сироватки	Активність ЛПС-АГ SE з гомо- та гетерологічними сироватками в ІФА
<i>Salmonella Enteritidis</i>	> 1:400
<i>Salmonella Pullorum-Gallinarum</i>	< 1:100
<i>Escherichia coli</i>	< 1:100
<i>M. av. ssp. paratuberculosis</i>	< 1:100

**Висновки.** Таким чином, препарат ліпополісахаридного антигену *Salmonella Enteritidis*, отриманий обробкою фенолом, відповідає вимогам з активності, специфічності й може бути використаний для створення набору ІФА з виявлення антитіл до збудника *Salmonella Enteritidis* у курей.

Використання цього антигену також дозволяє виявляти імуноферментним методом сальмонельозні антитіла в сироватках крові не тільки курей, а й тварин (за наявності відповідного кон'югату).

Можна припустити, що наведений спосіб отримання ЛПС-АГ придатний не тільки для бактерії *Salmonella Enteritidis*, а й для епідеміологічно та епізоотологічно значимих сальмонел інших серогруп.

**Перспективи подальших досліджень.** Дані, що отримали, підтверджують перспективність проведених досліджень для розробки вітчизняних імуноферментних тест-систем щодо виявлення специфічних антитіл при серологічній діагностиці сальмонельозу тварин, птиці.

#### Список літератури

1. Salmonellosis [Electronic resource]. – Access mode : [www.oie.int](http://www.oie.int). -10/05/12. – Title from the screen.
2. Еропов, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа [Текст] / А.М. Еропов, А.П. Оленов, Е.М. Гаврилова. – М. : Высш. шк., 1991. – 288 с.
3. Bredford, M.M. Determination of antigen specificity an indirect ELISA [Text] / M.M. Bredford // An. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

SELECTION OF THE METHOD OF PURIFYING ANTIGEN OF BACTERIA *SALMONELLA ENTERITIDIS* FOR INDIRECT ELISA

Dragut S.S., Stegnyy B.T.

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

According to the research there was selected method of purify antigen of bacterium *Salmonella Enteritidis* (SE) for indirect ELISA. There was found that the drug of liposaccharide antigen (LPS-AG) SE, received by treatment with phenol, is active and specific and can be used to develop a kit for ELISA for the detection of antibodies to this pathogen in chickens, and in animals if appropriate conjugate is used. There was assumed availability of this method for the reception LPS-AG not only for bacteria *Salmonella Enteritidis*, but also for other epidemiologically and epizootologically significant *Salmonella* serogroups.

УДК 619:616.98:578.823.2

## ПОДБОР ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ РЕПРОДУКЦИИ РЕОВИРУСА ТИПА I

Ефимова М.А.

Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБУ «ФЦРБ-ВНИВИ»),  
г. Казань, Российская Федерация

Реовирусы из семейства *Reoviridae* широко распространены и играют важную роль в патологии человека и животных. Отличительной особенностью реовирусов является наличие сегментированной двухцепочной РНК, способность к гемагглютинации и характер их репликации [1, 7].

Реовирусы вызывают цитопатический эффект (ЦПЭ) в культуре клеток KB, HeLa, BS/C-1, Vero, CV-1 и различных типов клеток обезьян [5, 6]. При выделении обычно используют клетки почек макака (Vero) и перевиваемые линии почек поросят (PK-15) или мышинные фибробласты («L») [2, 4]. По литературным данным реовирусы хорошо размножаются и вызывают цитопатический эффект на культурах многих видов приматов и домашних животных [3].

В связи с этим, целью исследований явилось изыскание оптимальной модели культуры клеток для получения вирусного сырья с высокой биологической активностью.

**Материалы и методы исследований.** Для исследований использовали реовирус типа I штамм «Reo I Lang» с гемагглютинирующим титром 1:32. Перевиваемые культуры клеток – Vero, почки эмбриона коровы (MDBK), почки теленка (ПТ-80), легкие эмбриона коровы (ЛЭК), РК-15, почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13), для опытов использовали с полностью сформированным монослоем. Время культивирования зависело от проявления цитопатического действия (ЦПД). В случае отсутствия ЦПД время культивирования продолжалось до 7 суток.

Эффективность накопления реовируса в перевиваемых культурах клеток оценивали с учетом времени проявления ЦПД вируса и гемагглютинирующей активности (ГА) в 3 серийных пассажах.

**Результаты исследований.** По результатам исследований установлено, что адаптация реовируса в клеточных культурах Vero, MDBK, ПТ-80, РК-15, ВНК-21/13 наступала в течение 1–2 пассажей. Время появления ЦПД 48–96 часов. Характер проявления ЦПД на культуре клеток Vero представлен на рисунке.

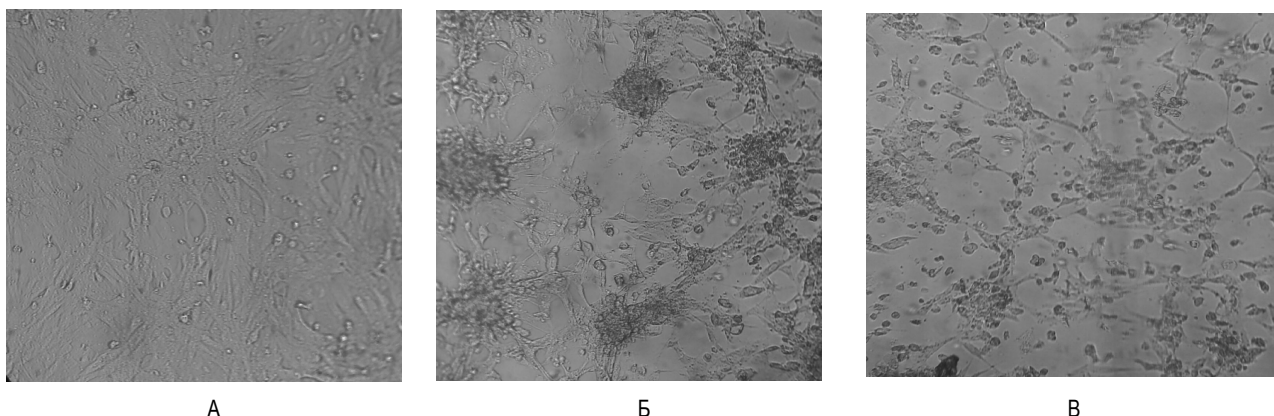


Рис. Перевиваемая культура клеток Vero до и после заражения реовирусом типа I (шт. «Reo I Lang»)

**Примечание:** А – до заражения; Б – после заражения через 72 часа; В – после заражения через 96 часов.

В период максимального проявления ЦПД гемагглютинирующий титр в указанных клеточных культурах составлял 1:32–1:64. Результаты опыта отражены в таблице.

**Таблица – Чувствительность различных культур клеток к реовирусу типа I шт. «Reo I Lang»**

Культура клеток	Время наступления ЦПД, ч	Титр ГА, обратная величина разведения, $M \pm m$ , $n=4$
Vero	72-96	$48,0 \pm 10,6$
MDBK	72-96	$72,0 \pm 23,2$
ЛЭК	96	$12,0 \pm 2,6$
РК-15 «н/с»	72-96	$96,0 \pm 21,3$
РК-15 «э/с»	24-48	$160,0 \pm 36,9$
ВНК-21/13	48-72	$64,0 \pm 26,1$
ПТ-80	72-96	$40,0 \pm 9,2$

**Примечание:** «н/с» – нормальная сыворотка крупного рогатого скота; «э/с» – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.