

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до способів одержання антигену для діагностики вірусного ентериту гусей. Не дивлячись на те, що захворювання вивчається більше 15 років, ще недостатньо вивчена антигенна структура вірусу, способи концентрації та очистки, не розроблені сучасні методи лабораторної діагностики захворювання.

Існує спосіб одержання антигену вірусу синдрому зниження яйценоскості - 76 курей (А.С. 1412067 А61К39/00, 1986г.) та спосіб одержання антигену для діагностики полурозу-тифу птиці (А.С. 1510155, А61К39/02, 1987р.). Ці способи передбачають зараження вірусом, культивування та очистку вірусної маси. Одержані антигени можуть використовуватись в імуноферментному аналізі, але недоліком цих способів є їх мала ефективність при одержанні антигенів.

Найбільш близьким, до заявляемого, є спосіб діагностики вірусного ентериту гусей в реакції імуноферментного аналізу. Спосіб включає концентрацію вірусу, очистку вірусу хлороформом, дезинтеграцію, центрифугування та ультрацентрифугування. (Автореферат. Фадель М.М. Діагностика вірусного ентерита гусей методом ИФА. Москва, 1989г.) На першому етапі очистки проводили концентрацію за допомогою ПЕГ та кількарразове центрифугування. Дезинтеграцію проводили при 20кГц на протязі 5 хвилин. Подальшу неодноразову очистку проводили за допомогою хлороформу. Освітлення вірусвміщуючої рідини проводили центрифугуванням при 5000об/хв на протязі 30 хвилин. Останнім етапом було ультрацентрифугування в градієнті сахарози на протязі 2 годин, а потім в градієнті хлористого цезію при 100000g на протязі 4 годин. Цей спосіб може бути прототипом. Недоліком цього способу є те, що він є дороговартісним та трудоемким, так як включає в себе багаторазові етапи очистки вірусу, що призводить до втрати кількості очищеного вірусвміщуючого матеріалу. Цей спосіб дозволяє виділити всього 79% вірусу ентериту гусей.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб одержання антигену для діагностики вірусного ентериту гусей в реакції ІФА, що включає концентрацію вірусу, очистку, ультрацентрифугування шляхом одноразової очистки, та ультрацентрифугування одним етапом, щоб забезпечити ефективність способу одержання антигену для діагностики вірусного ентериту в реакції ІФА.

Спосіб виконується таким чином. Концентрують вірус: Первинно - трипсинізовану культуру клітин гусячих ембріонів (культуру гусячих фібробластів) готують загальноприйнятим методом. Суспензію культурального вірусвміщуючого матеріалу вивільняли центрифугуванням від клітинного детриту і осаджували ПЕГом. Ресуспензований осад очищали хлороформом і концентрували високошвидкісним центрифугуванням в градієнті сахарози.

#### Приклад 1

Культуральну суспензію клітин, одержану загальноприйнятим методом, вивільняли від клітинного детриту центрифугуванням при 900g на протязі 10 хвилин для осадження великодисперсних компонентів. Для осадження антигену до супернатанту добавляли ПЕГ з молекулярною масою 6000 до кінцевої концентрації 8% та витримували 16 годин при 4°C. Перед внесенням ПЕГ в вірусвміщуючу суспензію додавали хлористий натрій до 10г/л. Осад збирали центрифугуванням при 900g на протязі 20 хвилин та ресуспендували в 0,02М фосфатносолевому буфері (ФСБ) рН7,5. Потім очищали однаковим об'ємом хлороформу при струхуванні на протязі 10 хвилин та збирали надосадову рідину після центрифугування при 900g на протязі 15 хвилин. Одержаний таким чином вірус очищали ультрацентрифугуванням в градієнті сахарози при 100000g на протязі 2 годин та використовували як антиген (вірусу ентериту гусей - ВЕГ) для постанови реакції ІФА.

#### Приклад 2

Активність та специфічність одержаного антигену визначали в непрямому варіанті ІФА, та виключали неспецифічні реакції. Досліджуваний антиген повинен специфічно реагувати з сироватками маючими антитіла до вірусу ентериту гусей. Для цього антиген розводили до 3мкг/мл в КББ (карбонатно бікарбонатний буфер) та імунобілізували на планшет. Після інкубації протягом 18 годин при 4°C, або 2-х годин при 37°C розчин антигену видаляли та вносили блокуючий розчин. Потім інкубували 1 годину при кімнатній температурі та промивали буфером. В лунки планшету вносили позитивну і негативну сироватки до вірусу ентериту гусей до вірусу ССЯ, інфекційного бронхіту курей, антивидовий імунопероксидазний кон'югат проти імуноглобулінів гусей, субстратний буфер. Проводили непрямий твердофазний аналіз за стандартною методикою, результати якого наведені в таблиці 1. Для встановлення інтенсивності фарбування продуктів ферментативної реакції визначали їх оптичну величину (ОП) за допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 492нм з подальшим обчисленням оптичної величини (ОВ) по формулі:

$$ОВ = \frac{ОП_{\text{досліджуваного зразку}}}{ОП_{\text{контрольного зразку}}}$$

Реакцію вважали позитивною, якщо показник оптичної величини більш чи дорівнює 2.

Наприклад, при визначенні антитіл до вірусу ентериту гусей в сироватках крові гусей оптична щільність досліджуваного зразку дорівнювала 0,890, оптична щільність контрольного зразку, тобто сироватки крові, що не містить антитіл до вірусу ентериту гусей, дорівнювала 0,344.

Таким чином, спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу ентериту гусей є ефективним, чутливим та дає змогу відтворення тестів визначення антитіл до вірусу ентериту гусей в ІФА.

Поділяли 0,890 на 0,344 і отримали показник ОВ - 2,56.

Таблиця 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	0,890	0,650	0,470	0,389	0,290						
B	+	0,895	0,640	0,460	0,380	0,273						
C	-	0,344	0,300	0,205	0,154	0,100						
D	-	0,340	0,299	0,195	0,150	0,094						

