

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології і може бути використаний для діагностики ротавірусної Інфекції новонароджених телят і поросят,

Відомий спосіб приготування специфічного антигена з фекалій хворих ротавірус-ним гастроентеритом дітей (Zlssls G., Ljambert J.P., De Kegel D. Routine diagnosis of human rotavirus In stools. - J. Clin. Pathol., 1978, vol. 31, p. 175-178), який базується на дворазовому послідовному центрифугуванні суспензії фекалій в фосфатно-буферному сольовому розчині при 5 тис. обертів за хвилину на протязі 10 хвилин. Надосад після повторного центрифугування використовується як антиген. Від антикомплемента-рності звільняються додаванням рівного об'єму сироватки крові плодів великої рогатої худоби.

Однак існуючий спосіб із-за низької активності та високої антикомплемента-рності отриманого антигена не характеризується високою діагностичною ефективністю. Крім того, із-за недостатньої очистки і концентрування в підготовлених таким способом матеріалах дуже важко виявити ротавірус під електронним мікроскопом.

В основу винаходу поставлено задачу забезпечення можливості виявлення в реакції зв'язування комплемента (РЗК) ротавірусного антигена в польових матеріалах від хворих та загинув тварин, а також підвищення ефективності діагностики ротавірусної Інфекції в реакції дифузної і преципітації (РДП) та методом електронної мікроскопії шляхом підготовки польового матеріалу для дослідження, який включає попередню очистку суспензії фекалій, вмістимого кишечника та органів загинув тварин хлороформом, концентрування надосаду поліетилеогліколем (ПЕГ), фільтрування отриманої суспензії через тканину Петрянова, виділення вірусу при розчиненні сорбційного шару тканини в хлороформі з одночасним переводом його у фізіологічний розчин при струшуванні (після додавання 1/10 -1/100 фізіологічного розчину від початкового об'єму суспензії) та відділення хлороформу від кінцевого продукту - антигена центрифугуванням.

Обробка суспензії дослідного матеріалу хлороформом дає можливість очистити її від баласту та чутливих до дії хлороформу вірусів.

При концентруванні ПЕГ-ом "очищеної суспензії відбувається руйнування заряджених сольованих оболонок навколо вірусних частин. Це дає можливість сорбувати вірус на сорбційному шарі тканини Петрянова. Вона являє собою фільтруючий двошаровий матеріал ФПП-15-1,5, який випускається промисловістю. Нижній шар-марля, верхній - сорбційний матеріал, який розчиняється в хлороформі, але неактивний в біологічних середовищах. Відомо використання цієї тканини в якості фільтра газових середовищ в хімічних виробництвах, для сорбції ен-теровірусів із стічної води а подальшим їх елююванням.

Розчинення верхнього шару тканини із сорбованим на ньому вірусом проводиться при поступовому внесенні хлороформу до повного розчинення тканини. Чутливі до дії хлороформу віруси, які могли б вплинути на специфічність виділеного антигена, руйнуються. Ротавірус, як відомо, до хлороформу не чутливий. Тому, після додавання фізіологічного розчину, в останній переходить практично весь ротавірусний антиген. Відділення хлороформу проводять центрифугуванням. Мінімальна кількість фізіологічного розчину, що додається, залежить від зручності відділення хлороформу в процесі центрифугування і складає 0,1-1 см, тобто дає можливість концентрувати вірус в 10-10 раз, що забезпечує його високу активність. Отриманий антиген може бути використаний для діагностики в РЗК (після* по передньої обробки сироваткою крові плодів великої рогатої худоби в співвідношенні 1:1). Розроблений спосіб значно підвищує вірогідність виявлення вірусу під електронним мікроскопом і в РДП. При використанні такого антигену рот вірусна Інфекція у новонароджених тварин надійно, з високою достовірністю діагностується за 1-2 дні, що дає можливість своєчасно проводити профілактику і лікування.

Таким чином, нами вперше в світі використана відома хімічна властивість сорбційного шару тканини Петрянова розчинятись в хлороформі для виділення концентрованого ротавірусу з польових матеріалів.

Спосіб здійснюється слідуючим чином: з фекалій, вмістимого кишечника та органів загинув тварин готують 10%-ну суспензію на фізіологічному розчині або розчині Хенкса (рН 7,2-7,4). Для звільнення від грубих частин суспензію фільтрують через 2-3 шари марлі, двічі по 30 хв центрифугують при 3-5 тис. обертів за хвилину та очищають хлороформом. Після центрифугування та видалення хлороформу до надосаду додають 8% поліетилеогліколя у вигляді порошка (по вазі), струшують 30 хв. та витримують при температурі 4°С на протязі 16-18 год.

Через 16-18 год суспензію, оброблену ПЕГ-м, фільтрують через тканину Петрянова, використовуючи фільтр Зейтца. Розміщують її на дрібнопористу металеву сітку таким чином, що сорбційний шар тканини був зверху, після чого монтують у фільтр Зейтца.

Після закінчення фільтрації-сорбції сорбційний шар тканини Петрянова обережно знімають разом з осадом і розчиняють в хлороформі, поступово добавляючи його при струшуванні до зникнення візуально видимих частин тканини. Додавши фіз.розчин (1 /10-1/100 від початкового об'єму суспензії польового матеріалу), проводять струшування 30-40 хв. потім - центрифугування 20-30 хв. при 3-4 тис. обертів за хвилину. У верхньому шарі міститься концентрований в 10-10³ вірус. З метою зниження антикомплемента-рності антиген обробляють сироваткою крові плодів великої рогатої худоби у співвідношенні 1:1.

Спосіб дозволяє підвищити комплементзв'язуючу і преципітуючу активність отриманого з польового матеріалу антигена до такого рівня, що він може бути використаний в РЗК і РДП з

метою серологічної діагностики ротавірусної Інфекції новонароджених тварин. Комплементзв'язуюча активність антигена досить висока, титр його 1:64-1:128. З діагностичною Імунною сироваткою в РДП утворюється чітка лінія преципітації.

Порівняльне вивчення в РЗК, РДП та методом електронної мікроскопії матеріалів, отриманих від хворих ротавірусною Інфекцією телят і поросят, які оброблялись різними способами, показано, що за допомогою запропонованого способу вдалось значно знизити антикомплементарність в антигенах з польових матеріалів при дослідженні їх в РЗК, і таким чином забезпечити можливість використання цього методу для прискореної діагностики ротавірусної інфекції у телят і поросят, а також суттєво підвищити ефективність РДП і електронної мікроскопії для діагностики та вивчення цього захворювання сільськогосподарських тварин (табл. 1, 2,3).

З матеріалів табл. 1 видно, що підготовка польових матеріалів для дослідження їх в РЗК по розробленому нами способу дозволяє в 85% проб повністю позбутись антикомплементарності, а в решти 15% знизити її до такого рівня (2 логг), який не є перешкодою для виявлення специфічного антигена, титри якого досягають 5,0-6,0 логг (табл. 2). В той же час, підготовка польових матеріалів для дослідження їх в РЗК згідно відомих методик або зовсім не знижувала антикомплементарності, наприклад, після центрифугування, або таке зниження було частковим, що не дозволяє ефективно вести прискорену діагностику ротавірусної Інфекції в РЗК.

В табл. 2 показано, що підготовка польових матеріалів по розробленому нами способу в 2-3 рази підвищує діагностичну ефективність РЗК ІРДП не лише по кількості виявлених позитивних проб, але й по титрах специфічного антигена. Крім того, розроблений спосіб приготування ротавірусного антигена дозволив підвищити ефективність електронної мікроскопії при дослідженні польових матеріалів в 3-6 разів (табл. 3).

Таким чином, розроблений спосіб приготування ротавірусного антигена з польових матеріалів значно відрізняється від запропонованих раніше не лише по технології виконання, але й високою якістю отриманого препарату.

Впровадження запропонованого способу приготування ротавірусного антигена не вимагає спеціального складного та дорогого обладнання. Його використання доступне для широкої мережі вірусологічних лабораторій.

Таблиця 1

Результати порівняльного вивчення в РЗК антикомплементарності
підготованих різними способами матеріалів, отриманих від хворих
та загиблих телят і поросят при ротавірусній інфекції

| Метод підготовки матеріалу | Досліджено проб | К-сть проб з анти- комплементарни- ми властивостями | Титри антикомплементарності в лог ₂ |
|--|-----------------|---|---|
| По розробленому способу | 21 | 3 | 2,0 |
| Центрифугування (прототип) | 21 | 21 | 6,0-7,0 |
| Очистка хлороформом та концентрування ПЕГ-м | 21 | 12 | 4,0-6,0 |

Таблиця 2

Результати виявлення ротавірусного антигена в підготованих різними
способами польових матеріалів, отриманих від хворих
та загиблих телят і поросят при ротавірусній інфекції

| Метод підготовки матеріалу | Дослідже- но проб | Виявлено ротавірусний антиген | | | |
|--|----------------------|-------------------------------|---------------------------|-------|---------------------------|
| | | в РЗК | Титри (лог ₂) | в РДП | Титри (лог ₂) |
| По розробленому способу | 21 | 18 | 5-6,0 | 18 | 4,0 |
| Центрифугування (прототип) | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Очистка хлороформом та концентрування ПЕГ-м | 21 | 9 | 3-4,0 | 6 | 1-2,0 |

Таблиця 3

Результати виявлення за допомогою електронної мікроскопії ротавіруса в
підготованих різними способами польових матеріалах, отриманих від
хворих телят і поросят при ротавірусній інфекції

| Метод підготовки матеріалу | Досліджено проб | Виявлено ротавірус |
|--|-----------------|--------------------|
| По розробленому способу | 21 | 19 |
| Центрифугування (прототип) | 21 | 3 |
| Очистка хлороформом та концентрування ПЕГ-м | 21 | 6 |