



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. №

000

(19) **SU** (11) **1607577**

A1

(51)5 G 01 N 33/531

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4416741/30-14

(22) 09.03.88

(71) Киевский научно-исследовательский институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В.Громашевского

(72) В.А.Мухопад, В.Т.Ковтун, Р.А.Сажок и А.М.Щербинская

(53) 615.373(088.8)

(56) Вопросы вирусологии, 1959, № 4, с. 465-470.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГРИППОЗНОЙ СЫВОРОТКИ

(57) Изобретение относится к вирусологии и иммунологии и может быть использовано для идентификации штаммовой принадлежности вирусов гриппа. Цель изобретения - упрощение способа.

2
Цель достигается тем, что в качестве продуцентов иммунной сыворотки используют белых беспородных крыс, предварительно отбираемых по отсутствию в сыворотке групповых антигемагглютининов и неспецифических ингибиторов, а в качестве иммуногена используют очищенную и сконцентрированную путем сорбции-элюции на куриных эритроцитах или ультрацентрифугирования взвесь вируса, инаktivированную ультрафиолетовыми лучами. При этом крыс иммунизируют внутрибрюшинно иммуногеном с гемагглютинирующей активностью (1:1024)-(1:2048) дважды с интервалом 6-8 дней, а через 20-22 дня от начала иммунизации отбирают иммунную сыворотку. 4 табл.

Изобретение относится к вирусологии и иммунологии и может быть использовано для идентификации штаммовой принадлежности выделенных из разных источников вирусов гриппа, новых штаммов вируса гриппа, определения степени антигенного родства штаммов, расшифровки этиологии эпидемий гриппа и диагностики гриппа.

Цель изобретения - повышение специфичности антигриппозной сыворотки за счет получения штаммоспецифической сыворотки.

Способ осуществляется следующим образом.

Белых беспородных крыс иммунизируют облученным ультрафиолетовыми лучами в энергетической дозе 4500-42-90

5400 Дж/м² вирусом гриппа с гемагглютинирующей активностью 1:1024 и выше в объеме 1,0 мл внутрибрюшинно дважды, с интервалом 6-8 дней, а сыворотку отделяют через 20-22 дня.

Способ осуществляется следующим образом.

Для иммунизации отбирают белых беспородных крыс массой тела 180-220 г путем исследования крови на содержание гриппозных антигемагглютининов и неспецифических ингибиторов в реакции торможения гемагглютинации с вирусом гриппа. Иммунизируют только тех животных, в крови которых отсутствуют неспецифические ингибиторы и гриппозные антигемагглютинины. Затем получают гриппозный иммуноген. Для этого

(19) **SU** (11) **1607577** **A1**

РПФ

аллантоисную культуру вируса гриппа очищают и концентрируют методом сорбции - элюции на куриных эритроцитах или ультрацентрифугирования до титра гемагглютинирующей активности 1:1024 и выше и помещают в чашки Петри таким образом, чтобы толщина слоя равнялась 1,0 мм. Чашки облучают ультрафиолетовыми лучами в энергетической дозе 4500-5400 Дж/м² (под ртутно-кварцевой лампой ПРК-7 на расстоянии 45-50 см от центра лампы 2,5-3 мин). Полученным таким образом вирусом с инактивированной инфекционностью иммунизируют белых беспородных крыс внутрибрюшинно в объеме 1,0 мл дважды с интервалом 6-8 дней. Затем через 20-22 дня проводят забор крови и отделяют штаммоспецифическую антигриппозную сыворотку.

Пример 1. Аллантоисную культуру штамма вируса гриппа А (Филиппины) 2/82 (ИЗ 2) очистили и сконцентрировали методом сорбции - элюции на куриных эритроцитах до титра гемагглютинирующей активности 1:1024. Инфекционный титр равен 1:10000. Взвесь вируса толщиной слоя 1,0 мм в чашках Петри облучили разными дозами (от 2700 до 6750 Дж/м²) ультрафиолетовых лучей под ртутно-кварцевой лампой ПРК-7. Энергетическая доза облучения определена с помощью автоматического дозиметра ДАУ-81.

Динамика инфекционных и гемагглютинирующих свойств вируса гриппа в зависимости от дозы ультрафиолетового облучения приведена в табл. 1.

Минимальная энергетическая доза облучения, вызывающая полную инактивацию инфекционности вируса, составляет 3600 Дж/м². Максимальная доза, не вызывающая снижения гемагглютинирующего титра, составляет 5850 Дж/м². Таким образом, облучение вируса ультрафиолетовыми лучами в дозе 4050-5400 Дж/м² обеспечивает полную инактивацию инфекционности вируса при полном сохранении его гемагглютинирующих свойств. Эта доза получена на расстоянии 45-50 см от лампы за 2,5-3 мин.

Приготовленным таким образом вирусом гриппа с различной гемагглютинирующей активностью проиммунизированы по предлагаемому способу белые беспородные крысы и получены антигриппозные сыворотки.

Титры штаммоспецифической антигриппозной сыворотки в зависимости от дозы вируса и сроков получения сыворотки приведена в табл. 2.

Снижение дозы вируса до (1:512)-(1:256) приводило к выраженному снижению титров целевого продукта. Однократная иммунизация даже завышенной дозой вируса не обеспечивала получения достаточно высоких титров. У другой группы животных, иммунизированных вирусом в дозе (1:1024)-(1:2048), получали сыворотки в более ранние и более поздние сроки. На 17-19 день титры антигриппозных сывороток были существенно ниже, чем на 20-22 день. На 23-30 день титры сывороток существенно не изменялись. Таким образом, техническими параметрами способа являются: доза вируса для иммунизации равна 1,0 мл, гемагглютинирующая активность 1:1024 и выше двукратно, а срок отбора антигриппозной сыворотки - 20-22 день от начала иммунизации.

Пример 2. Сыворотки крови 4 белых беспородных крыс исследованы в реакции торможения гемагглютинации с вирусом гриппа. Во всех сыворотках в разведении 1:20 и выше отсутствовали гриппозные антигемагглютинины и неспецифические ингибиторы. Методом сорбции-элюции на куриных эритроцитах очищена и сконцентрирована аллантоисная культура штамма вируса гриппа В/Киев/663/84 до титра гемагглютинирующей активности 1:2048. Затем взвесь вируса облучали ультрафиолетовыми лучами в дозе 4500 Дж/м² под лампой РПК-7. Крыс иммунизировали по предлагаемому способу. Полученные сыворотки исследовали на наличие штаммоспецифических антител. Во всех сыворотках выявлено содержание антител к штамму В/Киев/663/84 в титрах (1:280)-(1:640). Антигриппозная сыворотка была исследована со штаммами вируса гриппа, циркулировавшими до и после появления В/Киев/663/84.

Дифференциация антигриппозной сывороткой штаммов вируса гриппа приведена в табл. 3.

Таким образом, полученная антигриппозная сыворотка В/Киев/663/84 четко дифференцирует штамм В/Киев/663/84 от других штаммов.

Сопоставлена специфичность антигриппозных сывороток, приготовленных

Т а б л и ц а 2

Гемагглютинирующая активность вируса	Количество антигриппозных сывороток с титрами					Всего
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640 и выше	
(1:512)-(1:256)	5	6	3			14
(1:1024)-(1:2048)		2	10	24	20	56
1:4096 и выше		1	6	14	8	29
Однократная иммуни- зация (1:4096)	4	4	1			9
Сроки отбора анти- гриппозной сыворотки						
17-19 день	5	6	4			15
20-22 день		2	10	24	20	56
23-30 день		1	4	8	7	20

Т а б л и ц а 3

Штаммы	Титры антигриппозной сыворотки В/Киев/663/84
В/Киев/663/84	1:280
В/Сингапур/222/79	<1:20
В/СССР/100/83	<1:20
В/Виктория/3/85	1:40
В/Энн Арбор/1/86	<1:20

Т а б л и ц а 4

Штаммы	Титры антигриппозной сыворотки В/СССР/100/83, полученной способами	
	предлагаемым	известным
В/Гонконг/5/72	1:20	1:320
В/Сингапур/222/79	1:80	1:320
В/СССР/100/83	1:320	1:320

Редактор С.Рекова

Составитель П.Бонарцев

Техред М.Ходанич

Корректор Л.Патай

Заказ 3935/ДСП

Тираж 458

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101