



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4679584/14

(22) 14.04.89

(71) Одесский научно-исследовательский институт вирусологии и эпидемиологии им. И.И.Мечникова, Одесское предприятие по производству бактериальных препаратов, Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа и Одесская городская клиническая инфекционная больница

(72) А.Г.Стопчанская, А.Д.Гайдаренко, Э.П.Корнеева и В.Ф.Зеваков

(53) 615.373(088.8)

(56) Корнеева Э.П. и соавт. Лабораторный регламент получения диагностикума сухого типа А или В, 1977.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГРИППОЗНОГО ЭРИТРОЦИТАРНОГО ДИАГНОСТИКУМА

(57) Изобретение относится к области медицины. Цель изобретения - повышение специфичности и стабильности гриппозного эритроцитарного диагностикума. Эта цель достигается тем, что процесс сенсибилизации эритроцитов антигенами вируса гриппа с помощью хлорида хрома завершают в присутствии неионного детергента тритона х-100 и связанный с эритроцитами антиген стабилизируют формалином. При этом достигается длительное сохранение пространственной структуры антигенов, комплементарных гомологичным антителам. Согласно изобретению способ осуществляется следующим образом. К 1 мл 50%-ного формализированных эритроцитов барана добавляют 8 мл физиологического раствора и 1 мл элюата вируса гриппа с титром гемагглютининов 1:512 - 1:2048, вносят 1 мл 0,3%-ного раствора хлорида хрома, смесь встряхивают и выдерживают 15 мин при 37°C, добавляют 10 мл 0,01%-ного раствора тритона х-100 (конечная концентрация 0,005%), центрифугируют 5 мин и из осадка эритроцитов готовят 5%-ную взвесь, которую обрабатывают раствором формалина в конечной концентрации 0,05%. Полученный по предлагаемому способу препарат обладает высокой специфичностью и стабильностью, может быть использован для серологической диагностики гриппа и оценки иммунологической эффективности гриппозных вакцин. Предлагаемый способ может быть использован в производственных условиях. 3 табл.

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для диагностики гриппа и оценки иммунологической эффективности гриппозных вакцин. Разработанный способ присоединения к эритроцитам поверхностных антигенов вируса гриппа и их стабилизации может быть использован в производственных условиях и при проведении экспериментальных исследований.

31-91

Целью изобретения является повышение специфичности и стабильности гриппозного эритроцитарного диагностикума. Способ осуществляют следующим образом.

Готовят формализированные эритроциты барана по известной методике.

К 1 мл 50%-ных формализированных эритроцитов барана добавляют 8 мл физиологического раствора и 1 мл элюата

№ **SU** (11) **1672825** **A1**

вируса гриппа с титром гемагглютининов 1:512-1:2048, получаемого адсорбцией-элюцией на формализированных куриных эритроцитах. Смесь тщательно перемешивают, добавляют 1 мл свежеприготовленного 0,3%-ного раствора хлорида хрома и вновь тщательно перемешивают. Полученную суспензию выдерживают 15 мин при 37°C на водяной бане, периодически встряхивая. Затем вносят 10 мл 0,01%-ного раствора тритона х-100, приготовленного на забуференном физиологическом растворе pH 7,2. Полученную взвесь тщательно перемешивают и центрифугируют при комнатной температуре 5 мин при 2000 об/мин. Из осадка эритроцитов готовят 5%-ную взвесь на физиологическом растворе и обрабатывают формалином в конечной концентрации 0,05% в течение 1 ч. Эритроциты дважды отмывают физиологическим раствором, из осадка готовят 5%-ную взвесь сенсibilизированных эритроцитов на сахарно-пептоновой среде, состав которой приведен в лабораторном регламенте, и лиофильно высушивают. Концентрация формалина может варьироваться от 0,1 до 0,01% без существенного влияния на специфичность и чувствительность получаемого эритроцитарного диагностикума.

Из данных табл. 1 и 2 видно, что при связывании вируса гриппа А-Ленинград 83 (H3N2) хлоридом хрома без обработки тритоном х-100 получаемый эритроцитарный диагностикум выявлял антитела в коммерческой и специфической сыворотке в титре 1:320, тогда как после дополнительной обработки взвеси раствором тритона х-100 препарат выявлял противогриппозные антитела в этой же сыворотке в титре 1:1280-1:2560. При этом специфичность препарата также возрастала.

Из данных табл. 2 следует, что получаемый в присутствии тритона х-100 препарат выявлял специфические антитела в 64 раза более активно, чем гетерологичные, тогда как присоединение вируса гриппа только с помощью хлорида хрома обеспечивало получение менее специфичного препарата. Последний выявлял гетерологичные антитела всего в 4-16 раз менее активно, чем гомологичные. Таким образом, дополнительная обработка на заключительном этапе сенсibilизации

тритоном х-100 повышает не только чувствительность, но и специфичность гриппозного эритроцитарного диагностикума.

С целью усиления фиксации присоединенного антигена и стабилизации пространственной структуры антигенных детерминант препарат после окончания сенсibilизации обрабатывают 0,05%-ным формалином. При этом без уменьшения чувствительности препарата в 8-20 раз снижается уровень неспецифических реакций (см. табл. 3).

Таким образом, способ обеспечивает содержание в предлагаемом препарате такого количества сероподтипа вируса А, которое позволяет выявлять с помощью РТГА в коммерческой гомологичной сыворотке антитела в титре 1:640-1:2560 при титре антител в РТГА 1:160-1:320.

Пример 1. Вирусосодержащую аллантоисную жидкость вируса гриппа (Хабаровск 74/77 (H1N1) или А(Чили) 1/83 (H1N1) получают заражением 10-, 11-дневных куриных эмбрионов, которые культивируют в течение 72 ч при 35,5°C.

Формализированные эритроциты кур трижды отмывают физиологическим раствором и из осадка эритроцитов готовят 50%-ную суспензию в этом же растворе, добавляют вирусосодержащую аллантоисную жидкость вируса гриппа в количестве 10 мл на 1 мл 50%-ной суспензии эритроцитов. Взвесь тщательно перемешивают и оставляют на ночь (16-18 ч) при 4°C, затем центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин и 4°C. Надосадок отбрасывают, осадок ресуспензируют в 3,5%-ном растворе NaCl, количество которого в 10 раз меньше, чем количество добавленной вирусосодержащей жидкости. Взвесь тщательно перемешивают и помещают на водяную баню при 37°C на 2,5 ч, центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин, надосадок (элюат) собирают, определяют в нем титр гемагглютининов. Формализированные эритроциты барана трижды отмывают физиологическим раствором, готовят 50%-ную суспензию эритроцитов в этом же растворе. К 1 мл указанной суспензии добавляют 8 мл физиологического раствора и 1 мл элюата вируса гриппа с титром гемагглютининов 1:512-1:2048, смесь тщательно перемешивают и добавляют 1 мл свежеприготовленного

0,3%-ного раствора хлорида хрома и вновь тщательно перемешивают. Полученную суспензию выдерживают 15 мин при 37°C на водяной бане, периодически встряхивая (каждые 3-5 мин). Затем вносят 10 мл 0,01%-ного раствора тритона х-100, приготовленного на забуференном физиологическом растворе pH 7,2, смесь тщательно перемешивают и центрифугируют при комнатной температуре 5 мин при 2000 об/мин. Из осадка эритроцитов готовят 5%-ную взвесь на физиологическом растворе и обрабатывают формалином в конечной концентрации 0,05% в течение 1 ч. Взвесь центрифугируют 15 мин при 2000 об/мин и полученный осадок дважды отмывают физиологическим раствором. Из осадка готовят 5%-ную взвесь сенсibilизированных антигенами вируса гриппа эритроцитов в сахарозо-пептоновой среде. Для ее приготовления 10 г сахарозы растворяют в 199 мл 6,5%-ного раствора пептона. Полученную взвесь эритроцитов разливают в ампулы по 1 мл и высушивают в камерах ТГ-15; длительность сушки 48 ч. Определяют специфичность и чувствительность полученного диагностикума.

Пример 2. Выполняют те же операции, что и в примере 1, за исключением того, что используют вируссо-держательную аллантоисную жидкость вируса гриппа А(H3N2) - штамм А (Ленинград) 289/83. Представлены сравнительные результаты определения специфичности и чувствительности двух серий, полученных по предлагаемому методу гриппозных эритроцитарных диагностикумов, хранившихся в течение 2 лет.

Чувствительность гриппозного эритроцитарного диагностикума, получаемого с помощью хлорида хрома и тритона х-100

Эритроцитарный препарат	Титр противогриппозных антигенов (коммерческая антисыворотка к вирусу гриппа А(H3N2), серия 214	Контроль
Формализированные эритроциты, сенсibilизированные вирусом		

Таким образом, способ получения гриппозного эритроцитарного диагностикума обеспечивает по сравнению с прототипом следующие преимущества:

5 способность препарата дифференцировать антигены к серотипам вируса гриппа А и не давать перекрестных реакций с серотипом В, что в силу особенностей РТГА позволяет быстро устанавливать серотип эпидемического вируса в любой лаборатории;

10 стабильность пространственной структуры специфических антигенов в течение двух лет хранения препарата; исключение посредника с канцерогенными свойствами и предварительного этапа определения оптимальной дозы посредника.

20 Препарат может быть использован в практике здравоохранения для диагностики гриппа и определения серотипа эпидемического вируса гриппа А. Разработанный способ присоединения вируса гриппа может быть применен в производстве гриппозных диагностикумов и научных исследованиях.

Формула изобретения.

30 Способ получения гриппозного эритроцитарного диагностикума, включающий присоединение вируса гриппа к формализованным эритроцитам барана с помощью химического посредника, отличающийся тем, что, с целью повышения специфичности и стабильности препарата, присоединение осуществляют с помощью 0,03%-ного раствора хлорида хрома и сенсibilизацию завершают в присутствии 0,005%-ного раствора тритона х-100 в течение 5 мин, связанный с эритроцитами антиген фиксируют 0,05%-ным раствором формалина в течение 1 ч.

Таблица 1

Продолжение табл. 1

Эритроцитарный препарат	Титр противогриппозных антител (коммерческая антисыворотка к вирусу гриппа А(Н3N2), серия 214	Контроль
гриппа А(Ленинград) 289/83 (Н3N2) с помощью хлорида хрома (серия 1)	1:320	0
Формалинизированные эритроциты, сенсibilизированные вирусом гриппа А(Ленинград)289/83 (Н3N2) с помощью хлорида хрома (серия 2)	1:320	0
Формалинизированные эритроциты, сенсibilизированные вирусом гриппа А(Ленинград)289/83 (Н3N2) с помощью хлорида хрома и тритона х-100 (серия 3)	1:1280	0
Формалинизированные эритроциты, сенсibilизированные вирусом гриппа А(Ленинград)289/83 (Н3N2) с помощью хлорида хрома и тритона х-100 (серия 4)	1:1280	0

Таблица 2

Специфичность гриппозного эритроцитарного диагностикума, приготовленного из вируса А(Ленинград)289/83(Н3N2) с помощью хлорида хрома и тритона х-100

Эритроцитарные препараты, полученные с помощью	Титр противогриппозных антител в антисыворотках к вирусам гриппа			
	А(Н3N2) серия 214	А(Н1N1) серия 223	А(Н2N2) серия 217	В серия 216
Хлорида хрома	1:320	0	1:20	1:80
Хлорида хрома и тритона х-100	1:2560	0	1:40	1:40

Таблица 3

Влияние формалина на стабильность свойств гриппозного эритроцитарного диагностикума

Эритроцитарный диагностикум из штамма А(Ленинград)289/83 (Н3N2)	Титр противогриппозных антител в антисыворотках к вирусам гриппа					
	А(Н0N1)	А(Н1N1)	А2(Н2N2)	А(Н3N2)	В	контроль
Без обработки формалином	0	1:20	1:320	1:2560	1:320	0
С обработкой 0,05%-ным раствором формалина	0	0	1:40	1:2560	1:40	0

Редактор Т.Иванова	Составитель Г.Крюкова Техред М.Дидык	Корректор И.Самборская
Заказ 3330/ДСП	Тираж 289	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		

