



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102773** (13) **U**

(51) МПК (2015.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C12N 7/00

A61K 39/265 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 02688	(72) Винахідник(и): Циновий Олексій Васильович (UA), Наливайко Людмила Іванівна (UA), Рябінін Сергій Вікторович (UA), Шомін Олександр Анатолійович (UA), Ніколаєнко Юлія Юріївна (UA), Бондаренко Анжела Леонідівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 24.03.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2015, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ПТАХІВНИЦТВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, вул. Леніна, 20, с. Бірки, Зміївський р-н, Харківська обл., 63421 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО АНТИГЕНУ МЕТАПНЕВМОВІРУСУ КУРЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб визначення антитіл до антигену метапневмовірусу курей включає отримання вірусвміщуючого матеріалу, очищення та концентрування одержаного матеріалу і спектрофотометричні дослідження. Використовують культуральні розплідки штаму PVT-09/B з титром не нижче $5,6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$, одержаний матеріал очищують і концентрують у 3 етапи, спектрофотометричні дослідження проводять на рідері з використанням диференційного фільтра при 405-450 нм, і розраховують логарифмічні значення титрів антитіл у сироватках.

UA 102773 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології та біотехнології і може бути використана для діагностики метапневмовірусної інфекції курей (МПВ-інфекції) методом імуноферментного аналізу.

Своєчасний та вірно поставлений діагноз щодо МПВ-інфекції - це переважний успіх у боротьбі з даним захворюванням птиці. Існує нагальна проблема у розробці високочутливого експрес-методу діагностики метапневмовірусної інфекції, що дасть змогу проводити своєчасний контроль напруженості імунітету у курей, проводити моніторинг цього захворювання у птахогосподарствах України, прискорить проведення наукових досліджень. Реалізація ідеї створення вітчизняного діагностичного набору потребує вирішення складних і різноманітних задач, основними з яких є накопичення біомаси вірусу, його очищення і концентрування, та саме методичні підходи щодо його створення.

Велике значення має чистота очищення метапневмовірусу. Існує спосіб очищення метапневмовірусу птиці за допомогою макропористої гель-хроматографії [1]. Очищення вірусу з використанням макропористого скла (МПС) з діаметром пор у 1000 ангстрем (100 нм) має свої недоліки, оскільки пташиний метапневмовірус має розміри 80-200 нм, або зустрічаються плеоморфні віріони 150-200 нм у діаметрі і довжиною 1000 нм і більше [2]. Таким чином, виникає питання щодо відповідності розмірів пор МПС та розміру часток вірусу. Отже цим методом неможливо досягти високого рівня очищення вірусу. Більш високого ступеня очищення вірусу можна досягти, використовуючи метод ультрацентрифугування. Але й цей спосіб має декілька недоліків, а саме: осадження вірусу простим ультрацентрифугуванням при 75000 g може призвести до ефекту "флотації" вірусу у вірусвміщуючій рідині або до його руйнування. Щоб зменшити (нівелювати) ці негативні наслідки для концентрування деяких вірусів інколи використовують поліетиленгліколь, а для очищення - градієнт сахарози з урахуванням оптичної густини вірусу, що й було використано нами для очищення метапневмовірусу.

Найближчим аналогом заявленого способу очищення та концентрування метапневмовірусу, що пропонується, є (Патент UA № 73381) [3]. Це - спосіб очищення та концентрування реовірусу птиці, який включає очищення та концентрування реовірусу птиці з використанням центрифугування вірусного матеріалу з ПЕГ-6000 (поліетиленгліколем), обробку його ультразвуком та ультрацентрифугуванням через градієнт густини сахарози. Відомий спосіб (Патент UA № 60381) [4]. Це - спосіб очищення та концентрування вірусу ентериту гусей, який включає очищення та концентрування парвовірусу гусей з використанням центрифугування вірусного матеріалу з ПЕГ-6000, обробку його ультразвуком та детергентом, ультрацентрифугування через градієнти густини сахарози-хлористого цезію.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення антитіл до антигену метапневмовірусу курей, який дозволить підвищити чутливість та специфічність імуноферментного аналізу.

Поставлена задача вирішується способом визначення антитіл до антигену метапневмовірусу курей, який виконують наступним чином:

- 1) отримання вірусвміщуючого матеріалу з штаму PVT-09/B метапневмовірусу;
- 2) очищення та концентрування одержаного матеріалу;
- 3) спектрофотометричні дослідження;
- 4) розрахунок за визначеною формулою.

Вірусвміщуючий матеріал отримують із штаму PVT-09/B метапневмовірусу шляхом репродукції та накопичення його на перещеплюваній культурі клітин Vero, далі біомасу штаму метапневмовірусу двічі заморожують за температури мінус 20 °C з наступним відтаюванням до 4 °C.

Очищення та концентрування одержаного матеріалу проводять у 3 етапи.

1 етап. Попереднє очищення вірусу. Клітинний дебрис з культуральної рідини видаляють центрифугуванням при 1000 g (3000 об/хв) протягом 20 хв за температури 4 °C та збирають супернатант.

2 етап. Концентрування вірусу. Попередньо очищену біомасу вірусу змішують з 6 % ПЕГ-6000 (поліетиленгліколь) від загального об'єму і витримують протягом 2 год. за температури 4 °C, після чого проводять її центрифугування при 12000 g протягом 30 хв за температури 4 °C. Отримані осад ресуспензують у TSE-буфері (трис-сольовому буфері, pH=7,6).

3 етап. Завершальне очищення вірусу. Проби центрифугують у градієнті густини сахарози (20 %) при 76000 g впродовж 1,5 год. за температури 4 °C. Отриманий осад ресуспензують у TSE-буфері (до 10 мл).

Приклад 1. Контроль активності. Адсорбція отриманого високоочищеного антигену здійснювали з концентрацією білка не менше 5-10 мкг/0,1 см³ на планшети для імуноферментного аналізу. Сенсibiliзацію антигену на планшет проводили у буфері КББ

(карбонатно-бікарбонатний буфер), pH=9,6. Вірусний матеріал у робочому розведенні наносили на планшет, інкубували протягом 16-24 год. за температури 4 °С. Як блокуючий розчин використовували 10 % конячу сироватку, розведену у буферному розчині 0,05М TRIS-HCl=0,1 % ТВИН-290 і проводили непрямий варіант ІФА з позитивними референтними сироватками, титр яких становив не менше, ніж 1:3200-1:6400, що вказує на достатню активність антигену. Як детекторні антитіла використовували антивидовий імунопероксидазний кон'югат проти імуноглобулінів курей (виробництва AVES LAAB, США). Як субстрат застосовували АБТС (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Постановку ІФА проводили за стандартною методикою, облік реакції здійснювали з використанням рідера для спектрофотометрії.

Приклад 2. Контроль специфічності. У специфічних гетерологічних сироватках, що входять до складу комерційних наборів фірм IDEXX та BioChek (для визначення антитіл до інфекційного бронхіту курей, ньюкаслської хвороби, хвороби Гамборо, реовірусної хвороби птиці) не виявлено позитивних та сумнівних титрів до пневмовірусної інфекції, що вказує на специфічність отриманого антигену по відношенню до гомологічних антитіл.

Метапневмовірус нестійкий до фізичних та хімічних факторів (температурних коливань, дії хімічних речовин та тривалого ультрацентрифугування). Найкращі результати було отримано при використанні м'якого способу очищення та концентрування. Спосіб характеризується тим, що не порушується структура вірусу та не знижуються його антигенні властивості, це підтверджено чіткою роботою отриманого антигену у виготовленій тест-системі та його високою інфекційною активністю ($5,6 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$), що є його відмінною ознакою. Одержаний таким способом антиген є специфічним і ефективним при виготовленні діагностикуму ІФА для виявлення антитіл до метапневмовірусу.

Для встановлення кінцевого титру антитіл у досліджуваному зразку проводять спектрофотометричні дослідження для визначення його логарифмічного значення при заданому розведенні досліджуваної сироватки. Визначено робочі розведення компонентів для ІФА-діагностикуму: антигену метапневмовірусу, що наноситься на планшет у розведенні 1:500, антивидового кон'югату проти IgG курей - 1:4000, розведень сироваток 1:400. Спектрофотометричні дослідження проводять з використанням диференційного фільтра при 405-450 нм на рідері (спектрофотометрі).

Розрахунок проводять за допомогою формули, виведеної шляхом статистичного аналізу результатів, отриманих при тестуванні методом послідовних розведень сироваток. У відповідності з значеннями оптичних густин досліджуваних сироваток за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel побудовано калібрувальну криву й виведено рівняння лінійної регресії (формула) для обчислення логарифмічного значення титрів антитіл у сироватках:

$\lg T = 3,7981 + 0,8524 \cdot \lg (S/P \cdot 400)$, де:

$\lg T$ - логарифмічне значення титру в зразку;

3,7981 та 0,8524 - отримані в результаті математичного розрахунку коефіцієнти;

400 - розведення сироваток 1:400;

$S/P = (S - NKx) / (PKx - NKx)$,

S - значення оптичної густини досліджуваної сироватки;

P - значення оптичної густини позитивного контролю;

NKx - середнє значення оптичної густини негативного контролю;

PKx - середнє значення оптичної густини позитивного контролю.

За допомогою статистичного аналізу визначено позитивно-негативний поріг для тест-системи. Позитивними є сироватки з титром 850 і вище.

Наведений спосіб дозволяє підвищити чутливість та специфічність аналізу.

Джерела інформації:

1. Никитина Н.В. Получение антигена пневмовируса птиц для иммуноферментного анализа //Н.В. Никитина, Б.Б. Трефилов, Д.В. Дмитриев, А.Е. Романов //Новое в диагностике и профилактике болезней птиц. Материалы научно-практической конференции 3-4 июля 2008 г., г. Санкт-Петербург. - С. 94-97.

2. Борисова О.А. Метапневмовирусная инфекция птиц О.А. Борисова, И.А.Борисова //ФГУ "ВНИИЗЖ", г. Владимир. - 2007.- С. 13.

3. Патент KM 73381, A61K 39/00, C12N 7/00. Спосіб очищення та концентрування реовірусу. Опубл. 25.09.2012, бюл. № 18.

4. Патент UA № 60381, A61K 39/135, C12N 15/50, A61K 39/225, C07K 14/17, A61K 31/28. Спосіб очищення та концентрування вірусу ентериту гусей. Опубл. 25.06.2011, бюл. № 12.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб визначення антитіл до антигену метапневмовірусу курей, що включає отримання вірусвміщуючого матеріалу, очищення та концентрування одержаного матеріалу і
- 5 спектрофотометричні дослідження, який **відрізняється** тим, що використовують культуральні розплодки штаму PVT-09/B з титром не нижче $5,6 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, одержаний матеріал очищують і концентрують у 3 етапи, спектрофотометричні дослідження проводять на рідері з використанням диференційного фільтра при 405-450 нм, а логарифмічні значення титрів антитіл у сироватках розраховують за допомогою виведеної формули:
- 10 $\lg T = 3,7981 + 0,8524 \cdot \lg (S/P \cdot 400)$, де:
 $\lg T$ - логарифмічне значення титру в зразку;
 3,7981 та 0,8524 - отримані в результаті математичного розрахунку коефіцієнти;
 400 - розведення сироваток 1:400;
 $S/P = (S - NKx) / (PKx - NKx)$,
- 15 S - значення оптичної густини досліджуваної сироватки;
 P - значення оптичної густини позитивного контролю;
 NKx - середнє значення оптичної густини негативного контролю;
 PKx - середнє значення оптичної густини позитивного контролю.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601