



УКРАЇНА

(19) UA (11) 10625 (13) U

(51) 7 G01N33/533

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЙНОГО РИНОТРАХЕЇТУ АБО ВІРУСНОЇ ДІАРЕЇ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) u200505087

(22) 30.05.2005

(24) 15.11.2005

(46) 15.11.2005, Бюл. № 11, 2005 р.

(72) Четекіна Наталя Павлівна, Стегній Борис
Тимофійович, Кучерявенко Роман Олексійович,
Жукова Ірина Олексіївна, Стеценко Олександр
Володимирович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-

НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб серологічної діагностики вірусів, що
включає досліджування тест-об'єктів методом реа-
кції імуофлуоресценції (РІФ), використання міче-
них флуоресцеїнізотичіонатом (ФІТЦ)
γ- імуноглобулінів, який відрізняється тим, що як
тест-об'єкти використовують гіперімунні сироватки
крові курей або голубів.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, а саме до серологічної діагностики інфекційного ринотрахеїту (ІРТ) і вірусної діареї - хвороби слизових (ВД-ХС) великої рогатої худоби (ВРХ). Збудники цих хвороб відіграють провідну роль в етіології респіраторних, генітальних та шлунково-кишкових захворювань ВРХ, причиняючи економічні збитки внаслідок загибелі тварин, а також зниження продуктивності та приросту живої маси, порушення відтворювальної функції у телиць, корів та бугаїв, бракування хворих тварин.

Вірус ВД викликає пневмоентерити телят, аборти в корів у першій половині тельності, внутрішньоутробну інфекцію.

Вірус ІРТ вражає респіраторну, генітальну і нервову системи, слизові оболонки. Існують способи визначення вірусів з використанням реакцій нейтралізації, імуоферментного аналізу (ІФА), реакцій імуофлуоресценції (РІФ) та інші [Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина. - 1987. - 472 с.] - в цих способах використовують перещеплені клітини, що дорого коштують.

Є спосіб одержання флуоресцентно мічених антитіл [SU №1551089, от 20.04.88, кл. G01N 33/533] - за цим способом одержують кон'югати.

Існує спосіб діагностики вірусів визначенням флуоресценції клітин [UA №23678 від 19.11.96, кл. C12N 7/00, "Спосіб визначення вірусів"]. Це рішення може бути прототипом, але його не використовують саме для визначення вірусів ІРТ або ВД.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб серологічної діагностики вірусів, що включає досліджування тест-об'єктів методом РІФ, використання мічених флуоресцеїнізотичіонатом (ФІТЦ) імуноглобулінів, шляхом використан-

ня, як тест-об'єкта гіперімунної сироватки крові курей або голубів, щоб забезпечити спосіб серологічної діагностики інфекційного ринотрахеїту або вірусної діареї великої рогатої худоби.

Спосіб виконується таким чином:

Вірусом ІРТ шт. "Молдавський" з титром вірусу $10^{-7.5}$ ТЦПД₅₀/0,1 см³ або вірусом ВД-ХС шт. "Орегон" з титром $10^{-6.5}$ ТЦПД₅₀/0,1 см³ з додаванням неповного ад'юванта Фрейнда імунізують триразове півнів (курей) м'ясних порід масою 2-2,5 кг або статевозрілих голубів:

1-й раз внутрішньошкірно по 0,2 см³ у 4 ділянки спини, та внутрішньом'язово по 0,5 см³ - у 2 ділянки плечевих м'язів, та по 0,2 см³ - у подушечки пальців кінцівок.

2-й раз через 23 дні після 1-го введення у дозі по 0,5 см³ внутрішньом'язово у плечову та стегнову м'язи.

3-й раз через 21 день після 2-го введення таким же чином як і в попередніх.

Птахам контрольної групи вводили відповідно фізрозчин. Заморожену контрольну сироватку крові курей або голубів, яка не мала специфічних антитіл до вірусів ІРТ або ВД-ХС, розморожували при 3000 об/хв. протягом 10 хвилин і одержували чітку фракцію білка за допомогою висолювання сульфатом амонію.

Фракцію чіпбулінів з імунної сироватки птиці, яку одержали за допомогою неочищених антигенів і додаванням неповного ад'юванта Фрейнда, виділяли сульфатно-риваноловим методом.

Очищені сироватки мітили ФІТЦ, попередньо дослідивши співвідношення флюорохромом - бі-

(19) UA (11) 10625 (13) U

лок $\left(\frac{F}{p}\right)$ на спектрофотометрі. Якщо показник $\left(\frac{F}{p}\right)$ був 3 одиниці і нижче, то фракціонування γ -глобулінів не проводили. В інших випадках проводили розподіл γ -глобулінів на фракції за допомогою колоночної хроматографії на сефадексі Г-50. Якщо очищення фракцій було успішним, то відбувається зростання показника $\left(\frac{F}{p}\right)$. Фракцію, в якій був самий низький показник $\left(\frac{F}{p}\right)$ і самий високий відсоток білка, відкидали, а інші фракції перевіряли на фарбуючий титр та неспецифічне світіння. Доброю вважали таку фракцію γ -глобулінів, яка мала співвідношення $\left(\frac{F}{p}\right)$ не більше 3-х та кількість білку від 0,5 до 1%.

Фарбуючий титр специфічної сироватки відповідав титру віруснейтралізуючих антитіл.

Приклад 1

Фарбуючий титр і робоче розведення ФІТЦ-кон'югатів встановлювали на культурі клітин нирки вівці, або тестікулів ембріона корови, вирощених на предметних скельцях і заражених вірусами ІРТ або ВД-ХС. Через 14-16 годин після зараження, скельця з культурами клітин витягали з чашок Петрі, промивали забуферним фізіологічним розчином (ЗФР), висушували на повітрі і фіксували в ацетоні при температурі -20°C протягом 25 хвилин, а потім фарбували прямим методом РІФ з використанням дворазових розведень цих сироваток.

Фарбуючий титр встановлювали по яскраво-зеленому кольору специфічного антигена ІРТ, або ВД-ХС при мінімальному забарвленні оточуючого фону. Оцінку інтенсивності світіння проводили за допомогою системи обліку на 4 хреста. Препарати, які давали світіння на 3-4 хреста вважали позитивними.

Приклад 2

При виявленні антигена ІРТ або ВД-ХС, пофарбовані специфічними і контрольними кон'югатами, мазки витримували у вологій темній камері при температурі $20-25^{\circ}\text{C}$, протягом 30хв. Після чого з мазків струшували залишки кон'югату, промивали їх дистильованою водою та двічі промивали забуферним фізіологічним розчином протягом 10хв., додаваючи у другу порцію (ЗФР), фарбу синій

Еванса ($0,1\text{см}^3$ 0,1% розчину фарби на 100см^3 ЗФР) для гасіння неспецифічного світіння. Для препаратів з культурою клітин добавляли $0,3\text{см}^3$ 0,1% розчину фарби синій Еванса на 100см^3 (ЗФР). Пофарбований і висушений мазок досліджували у синє-фіолетових променях люмінесцентного мікроскопа.

Для виявлення антигена ІРТ або ВД-ХС непрямим методом РІФ, на зафіксований ацетоном мазок (культуру тканин) наносили не флуоресцюючу специфічну противірусну сироватку у робочому розведенні. Мазки вмищували у вологу камеру і інкубували при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30хв. Надлишок сироватки змивали дистильованою водою і мазок занурювали на 10хв. У ЗФР, після чого знову промивали дистильованою водою і висушували на повітрі. На мазок нашаровували антивидову сироватку у робочому розведенні, витримували у вологій камері протягом 30хв. при кімнатній температурі. Надлишок ФІТЦ-антиглобуліна струшували, промивали дистильованою водою і двічі по 10 хвилин відмивали ЗФР, додаючи в останню порцію фарбу синій Еванса.

Приклад 3

При проведенні досліджень використовували наступні контроли:

- препарати фарбували стандартними специфічними, міченими ФІТЦ-імунними сироватками у робочому титрі;
- препарати фарбували міченою ФІТЦ контрольною сироваткою птиці (негативний К) і стандартними нормальними флуорисцюючими сироватками;
- препарати фарбували гетерологічними міченими ФІТЦ сироватками (контроль на специфічність і диференційний діагноз);
- обробка препаратів, які не містять досліджувані антигени.

При обліку РІФ позитивною реакцією вважали наявність специфічної флуоресценції у препаратів в якому антиген вірусу ІРТ або ВД-ХС виявлявся у вигляді яскраво-зеленого дифузного світіння цитоплазми клітин, а також яскраво-зеленої зернистості, яка повністю або частково заповнює ядра клітин.

Спосіб серологічної діагностики інфекційного ринотрахеїту або вірусної діареї великої рогатої худоби є ефективним, економічним, простим у використанні, дає можливість у 8-10 разів збільшити об'єкт досліджень.