



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61416 (13) U
(51) МПК
G01N 33/533 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ КОРОНАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ЕКСПРЕС-МЕТОДУ

1

2

(21) u201013064

(22) 03.11.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) КУЧЕРЯВЕНКО РОМАН ОЛЕКСІЙОВИЧ, КУЧЕРЯВЕНКО ВІКТОРІЯ ВІКТОРІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби за допомогою експрес-

методу, що включає отримання вірусу, імунізацію, одержання гаммаглобулінової фракції сироватки, дослідження тест-об'єктів методом реакції імунофлуоресценції (РІФ), використання мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ) імуноглобулінів, отриманих з гіперімунної сироватки крові, який **відрізняється** тим, що використовують як вірус - коронавірус, концентрують його, одержують гаммаглобуліни сульфатним методом з подальшою очисткою іонообмінною хроматографією.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, а саме до діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби.

Коронавірусна інфекція великої рогатої худоби - контагіозне вірусне захворювання, яке характеризується хронічним перебігом з періодичним загостренням хвороби. Коронавірусна інфекція викликає переважно ураження кишечника, а у телят відмічаються також ураження бронхів і легенів. На цей час хвороба розповсюджена на території України та наносить великі економічні збитки.

Існують способи визначення вірусу з використанням реакції нейтралізації (РН) на культурі клітин, імуноферментного аналізу (ІФА), електронної мікроскопії та інші. (В.Н. Сюрин, А.Я. Самойленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. Вирусные болезни животных. - М.: ВНИИТИБП, 1998. - 928 с.). Але ці методи трудомісткі або потребують значних коштів для їх проведення.

Для діагностики вірусних хвороб в імунології відомий («Способ постановки реакции иммунофлуоресценции» Патент RU №1220176 от 28.02.1994, кл. А61К 39/00, А61В 10/00). Але цей спосіб використовується для імунофлуоресцентного аналізу поверхневих антигенів різних клітин (в тому числі лімфоцитів) за наявності спеціального обладнання для виконання вільного безперервного розподільного електрофорезу цих клітин, яке дороге коштує.

Існує «Спосіб серологічної діагностики інфекційного ринотрахеїту або вірусної діареї великої

рогатої худоби» (Патент UA №10625, від 30.05.2005, G01N 33/533). Це рішення може бути найближчим аналогом. Але цей спосіб неможливо використовувати для діагностики коронавірусної інфекції.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби за допомогою експрес-методу, що включає отримання вірусу, імунізацію, одержання гаммаглобулінової фракції сироватки, дослідження тест-об'єктів методом реакції імунофлуоресценції (РІФ), використання мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ) імуноглобулінів, отриманих з гіперімунної сироватки крові шляхом використання як вірусу - коронавірусу, його концентрації, одержання гаммаглобулінів сульфатним методом з подальшою гел'фільтрацією, щоб забезпечити діагностику коронавірусу великої рогатої худоби.

Спосіб виконують таким чином.

Концентрованим коронавірусом (штам «BC-1») імунізують кролів або курей триразово з інтервалом 10 діб: в подушечки пальців кінцівок у дозі 2 см³, внутрішньом'язово - 2 см³, внутрішньовенно - 1,5 см³, з подальшим знекровленням через наступні 12 діб. Виділення імуноглобуліну з сироватки крові проводять за допомогою висолювання сульфатом амонію з наступною очисткою глобулінів методом іонообмінної хроматографії.

Потім визначають концентрацію білка на спектрофотометрі та проводять кон'югацію ФІТЦем.

(13) U
(11) 61416
(19) UA

Приєднання ФІТЦу до білка проводять з розрахунку 2,0 мг ФІТЦа на кожні 100 мг білка. На спектрофотометрі визначають співвідношення флюорохром - білок (F/P). Якщо показник F/P дорівнює трьом одиницям і нижче, а відсоток білка становив від 0,5% до 1,0%, то цей білок використовують для подальшої роботи, а за інших умов проводять розділення на фракції за допомогою гелехроматографії на Тоуорепар/650М.

Специфічність і активність флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ визначають в реакції імунофлуоресценції за фарбуючим титром і в реакції гасіння флуоресценції. Фарбуючий титр і робоче розведення кон'югатів, які одержані лабораторним шляхом, визначають на культурі клітин ТрТ, НВ, КСТ, ЛЕК, які вирощені на накривних скельцях і заражені коронавірусом ВРХ. Через 48 годин після зараження, скельця з культурою клітин виймають з пробірок, промивають забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), висушують на повітрі та фіксують в ацетоні впродовж 25 хв. за температури мінус $(10,0 \pm 2,0)^{\circ}\text{C}$, а потім фарбують прямим методом РІФ за загальноприйнятою методикою з використанням дворазових розведень флуоресціюючого імуноглобуліну до коронавірусу ВРХ від 1:2 до 1:32. Специфічна флуоресценція у препаратах з антигеном коронавірусу ВРХ виявляється у вигляді яскраво-зеленого дифузного світіння цитоплазми інфікованих клітин на фоні ледь помітного світіння не інфікованих клітин. По мірі збільшення розведення флуоресціюючого імуноглобуліну яскравість світіння зменшується. Фарбуючим титром флуоресціюючого імуноглобуліну вважають те останнє його розведення, яке забезпечує світіння клітин, а робоче розведення імуноглобуліну - на порядок нижче, ніж фарбуючий титр. Фарбуючий титр повинен бути не менше ніж 1:8.

Для діагностичного дослідження у РІФ використовують шматочки слизової оболонки тонкого кишечника, брижеечні лімфатичні вузли, а також інфіковані культури клітин.

Приклад

Методика постановки реакції імунофлуоресценції для діагностики коронавірусної інфекції.

З поверхні зрізу проб патологічного матеріалу роблять мазки-відбитки на предметному склі або

наносять на його поверхню суспензію із зскрібків слизових оболонок, патматеріалу та інфікованих клітин, розподіляють тонким шаром і висушують при кімнатній температурі. Мазки фіксують у охолоджену ацетоні, в морозильній камері побутового холодильника при температурі від мінус 6°C до мінус 10°C 30 хвилин.

Зафіксовані мазки висушують на повітрі 3-5 хвилин, переносять у вологу камеру і фарбують специфічним флуоресцентним імуноглобуліном (ФІТЦ-кон'югатом) 30 хвилин, у темряві, при кімнатній температурі.

Через 30 хвилин ФІТЦ-кон'югат змивають дистильованою водою. Предметні скельця з мазками занурюють у забуферений фізіологічний розчин (рН 7,2-7,4) на 10 хвилин, після чого переносять на 10 хвилин у ЗФР, в який додають на кожні 100 см^3 0,1 см³ 0,1%-вого розчину синьки Еванса. Потім мазки просушують на повітрі й досліджують під іммерсією у люмісцентному мікроскопі.

Облік реакції проводять за інтенсивністю світіння інфікованих клітин і оцінюють за чотирьоххрестовою системою, а саме:

++++ - дуже яскрава флуоресценція зеленого кольору в цитоплазмі клітин;

+++ - яскрава флуоресценція зелено-жовтого кольору в цитоплазмі клітин;

++ - слабка флуоресценція жовтого кольору в цитоплазмі клітин;

"0" - цитоплазма клітин має темно-коричневе забарвлення.

Позитивною реакцією вважається флуоресценція клітин на ++++ та +++ хрести при негативних результатах контролів.

У способі використовують наступні контролі:

1. Обробка позитивних препаратів специфічною сироваткою (реакція гасіння флуоресценції);

2. Обробка позитивних препаратів негативною сироваткою;

3. Обробка препаратів, які не утримують вірусний матеріал.

Спосіб діагностики коронавірусної інфекції великої рогатої худоби за допомогою експрес-методу є ефективним, економічним, простим у використанні, дає можливість встановити діагноз протягом 2-3 годин.