



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61763 (13) A

(51) 7 G01N33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

(21) 2003043357

(22) 15 04 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р

(72) Стегній Борис Тимофійович, Білокінь Віктор  
Степанович, Фісенко Світлана Анатоліївна, Соло-  
війов Сергій Тихонович(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧ-  
НОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

2

(57) Спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу, що включає нанесення антигену на твердий носій, інкубацію з сироватками крові, які досліджують, з подальшим внесенням антивидового імунопероксидазного кон'югату та субстрату і визначенням продукту ферментативної реакції, який відрізняється тим, що як антиген використовують очищений ультрацентрифугуванням у градієнті щільності сахарози культуральний вірус діареї великої рогатої худоби

Винахід, що передбачається, відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології, може бути використаний для визначення антитіл у сироватці крові великої рогатої худоби (ВРХ)

В основі винаходу лежить використання очищеного у градієнті щільності сахарози антигену вірусу діареї та блокуючого розчину, що містить фосфатний буферний розчин (ФБР) і 0,5% сироватки крові коня

У лабораторній практиці для проведення серологічних досліджень щодо вірусу діареї ВРХ використовують реакцію нейтралізації, реакцію зв'язування комплементу, реакцію імунодифузії. Вищенаведені способи поступаються за специфічністю, чутливістю, тривалістю та трудомісткістю імуноферментному аналізу (ІФА)

Існує "Способ иммуноферментного определения антител к вирусу СПИД" (А.С. №1581022, от 30.06.88, G01N33/535). Цей спосіб застосовують тільки для визначення антитіл до вірусу СНІДу. Спосіб виконують активацією полістиролових планшетів синтетичними пептидами, а як білок у кон'югати використовують білок А. Цей спосіб не можливо застосовувати для визначення антитіл до вірусу діареї

Існує "Наставление по применению набора для определения антител к вирусу снижения яйценоскости кур иммуноферментным анализом, Россия, Минсельхозпрод, 25 ноября, 1999 г, №13-7-2/1792". Це рішення може бути прототипом

Спосіб ІФА для визначення антитіл містить нанесення антигену на твердий носій, інкубацію з антивидовим імунопероксидазним кон'югатом, внесення субстрату та визначення продукту перо-

ксидазної реакції. Недоліком способу є можливість використання його тільки для визначення антитіл до вірусу синдрому зниження несучості курей

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу, що містить нанесення антигену на твердий носій, інкубацію з сироватками крові, що досліджують, з послідовним внесенням антивидового імунопероксидазного кон'югату та субстрату і визначенням продукту ферментативної реакції шляхом використання як антигену очищеного ультрацентрифугуванням у градієнті щільності сахарози культурального вірусу діареї, щоб забезпечити спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу діареї ВРХ

Спосіб виконується таким чином. Аналіз проводять за слідуючою схемою. Для сенсibiлізації планшету у лунки вносять по 100мкл очищеного антигену вірусу діареї, планшет накривають кришкою та залишають на 18 годин при температурі 4°C. Після цього проводять трьохкратну відмивку планшету твін-фосфатним буферним розчином (ТФБР)

Для блокування неспецифічних місць зв'язування в лунки вносять по 100мкл 0,5%-ного розчину сироватки коня приготовленого на ФБР і інкубують 2 години в термостаті при температурі 37°C, після чого розчин видаляють і трикратно відмивають лунки планшету ТФБР

У лунки планшету вносять по 100мкл ТФБР. У першу лунку ряду А вносять 100мкл специфічної до вірусу діареї ВРХ сироватки крові, у першу лунку ряду В вносять 100мкл сироватки негативної, а в перші лунки рядів С, D, E, F, G і H - по 100мкл

(13) A

(11) 61763

(19) UA

досліджуваних сироваток крові і шляхом подвійних розведень розтитровують усі проби, ретельно перемішуючи їх. Після цього накривають і інкубують 2-3 години при температурі 37°C.

Після інкубації вміст лунок зливають і знову відливають від компонентів, що не зв'язались, ТФБР.

В усі лунки вносять по 100мкл антивидового іммунопероксидазного кон'югату, інкубують 1 годину при температурі 37°C, вміст лунок зливають і 4-5 разів відливають ТФБР.

Для виявлення продукту пероксидазної реакції вносять по 100мкл субстрату ABTS, інкубують 40-60 хвилин при кімнатній температурі в темряві. Ферментативну реакцію зупиняють додаванням по 50мкл 1,25М розчину сірчаної кислоти.

**Приклад 1** Для приготування антигену вихідну вірусмішущу культурану рідину піддавали одноразовому заморожуванню - відтаванню. Після цього вірусну суспензію освітлювали низькошвидкісним центрифугуванням (3000об/хв) протягом 20-30 хвилин. Супернатант збирали. Попередньо очищену від клітинного детриту низькошвидкісним центрифугуванням суспензію піддавали концентруванню вірусу за допомогою 6-8% ПЕГ-6000 або ультрафільтрації. В суспензію вірусу додавали при постійному перемішуванні 50% розчин ПЕГ до кінцевої концентрації 6-8% за сухою речовиною. Суміш витримували протягом 16-18 годин при температурі 4°C. Осад відокремлювали центрифугуванням при 5000об/хв протягом 30-40 хвилин і ресуспендували в мінімальному обов'язково визначеному об'ємі розчину Хенкса (рН 7,2-7,4) або суспензію вірусу пропускали через мем-

брани УАМ-300А на установці УФМ-3. Сконцентрований на мембрані вірус знімали змиванням мінімальним обов'язково визначеним об'ємом розчину Хенкса.

Сконцентрований таким чином вірус діареї осаджували в градієнті щільності сахарози на ультрацентрифузі при 70000g протягом 5-6 годин.

Виявлену за допомогою автоматичного колектору марковану фракцію, після визначення кількості загального білку, використовували як препарат антигену ВД ВРХ.

**Приклад 2** Для встановлення інтенсивності фарбування продуктів ферментативної реакції визначали їх оптичну величину (ОП) за допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 492нм з подальшим обчисленням оптичної величини (ОВ) по формулі

$$ОВ = \frac{ОП \text{ досліджуваного зразку}}{ОП \text{ контрольного зразку}}$$

Реакцію вважають позитивною, якщо показник оптичної величини більше чи дорівнює 2.

Наприклад, при визначенні антитіл до вірусу діареї в сироватках крові ВРХ оптична щільність досліджуваного зразку дорівнювала 0,648, а оптична щільність контрольного зразку, тобто сироватки крові, що не містить антитіла до вірусу діареї, дорівнювала 0,262. Поділяли 0,648 на 0,262 і отримали показник ОВ рівний 2,47.

Спосіб імуноферментного визначення антитіл до вірусу діареї великої рогатої худоби є ефективним, чутливим та дає змогу відтворення тестів визначення антитіл до вірусу діареї в ІФА.