



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64513 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/49 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
G01J 3/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ГРИПУ КОНЕЙ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

1

2

(21) u201104529

(22) 13.04.2011

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) СИНИЦІН ВІТАЛІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, КАП-РАЛЮК РОМАН ОЛЕГОВИЧ, СИНИЦІН АНАТОЛІЙ ЮЛІАНОВИЧ, СИНИЦИНА СВЕТЛАНА ДМИТРИЄВНА

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу коней методом імуноферментного

аналізу з використанням набору діагностичних компонентів, який **відрізняється** тим, що при застосуванні імуноферментного аналізу для діагностики грипу коней використовуються віруси, одержані шляхом культивування на курячих ембріонах та очищені і концентровані методом адсорбційної та молекулярно-ситової хроматографії на макропористих сорбентах; заявлений спосіб більш чутливий, експресний (захворювання діагностується протягом 2-3 годин), облік результатів автоматизований.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до лабораторної діагностики, призначеної для виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу коней, може бути використаний для експресної діагностики захворювань гриппозної етіології.

Аналог корисної моделі - близьким за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється є реакція зв'язування комплементу (РЗК). Принцип реакції заключається в тому, що антитіла приймають участь у зв'язуванні комплементу з вірусними поліпептидами. Недоліком вказаного методу є те, що він тривалий (2 доби), недостатньо чутливий та специфічний. Крім того, в РЗК не можна досліджувати антикомплементарні сироватки крові, які часто зустрічаються.

Найближчим аналогом корисної моделі є реакція гальмування гемаглютинації (РГГА), де використовується, як антиген інактивовані віруси грипу коней штаму А/кін'2/Кембридж/63/Н7N7, штаму А/кін'2/Майамі/63/Н3N8 які культивувалися на курячих ембріонах 9-денного віку, та у подальшому концентрувалися за допомогою ультрафільтраційного апарату на порожнистих волокнах. Гриппозний антиген для РГГА використовують рідкий або ліофілізований.

Постановка реакції гальмування гемаглютинації. Сироватки, що досліджуються, розводять 1:10 (0,1 см³ відповідної сироватки і 0,9 см³ фосфатно-

буферного розчину (ФБР) і інактивують при температурі 56 °С у водяній бані.

Для постановки РГГА у лунки планшета вносять по 0,05 см³ ФБР.

Потім у першу лунку вносять 0,05 см³ сироватки в розведенні 1:10 і готують дворазові розведення, починаючи з 1:20 до 1:1280. В кожен лунку вносять по 0,05 см³ відповідного антигену в робочому розведенні, в якому 0,05 см³ містять 4 гемаглютинуючі одиниці (ГАО). Щоб одержати робоче розведення антигену, треба значення його титру розділити на 4. Наприклад: титр антигену 16128, 128:4=32, робоче розведення антигену одержимо при 1:32.

Планшет залишають при кімнатній температурі на 20 хвилин. Потім у кожен лунку додають по 0,1 см³ 1 % суспензії курячих еритроцитів, обережно струшують і витримують при 24 °С 20 хвилин.

РГГА супроводжують такі контролі:

- контроль гіперімунних сироваток на неспецифічну гемаглютинацію. В три лунки планшета вносять по 0,05 см³ відповідної сироватки у найменшому розведенні (1:10) і додають по 0,05 см³ 1 % суспензії курячих еритроцитів;

- контроль курячих еритроцитів на спонтанну аглютинацію. Для цього в три лунки планшета вносять по 0,05 см³ ФБР і додають по 0,05 см³ 1 % суспензії курячих еритроцитів. Еритроцити в ФБР не повинні провокувати спонтанну аглютинацію;

UA (11) 64513 (13) U

- контроль робочої дози антигену. В п'ять лунк планшета, за виключенням першої, вносять по $0,05 \text{ см}^3$ ФБР, у першу й другу лунки вносять по $0,05 \text{ см}^3$ робочого розведення відповідного антигену. Після змішування із другої лунки переносять $0,05 \text{ см}^3$ рідини в третю і т.д., із п'ятої лунки $0,05 \text{ см}^3$ рідини видаляють. Далі, в усі лунки додають по $0,05 \text{ см}^3$ 1 % суспензії курячих еритроцитів;

- контроль негативної сироватки. Контрольну (негативну) сироватку розводять від 1:20 до 1:160 і титрують з антигенами, що входять до набору.

Облік результатів. Діагностичним титром сироваток, що досліджуються у РГГА, вважають розведення 1:40.

Реакція гальмування гемаглютинації недостатньо чутлива, трудомістка при масових серологічних дослідженнях, недостатньо об'єктивний візуальний облік результату реакції.

В основу корисної моделі, що передбачається поставлено задачу розробити спосіб шляхом розроблення набору діагностиків для виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу коней методом імуноферментного аналізу, який дасть можливість уникнути перелічених недоліків найближчого аналога.

Поставлена задача вирішується завдяки тому, що для постановки експресного методу (2-3 години) імуноферментного аналізу використовується культуральний хроматографічно очищений і концентрований грипоznий антиген. За даними параметрами рішення, що заявляється відповідає критерію "суттєві ознаки".

Суть корисної моделі полягає в тому, що до набору входить грипоznий антиген, одержаний при одночасному культивуванні на курячих ембріонах і концентрування якого проводили, використовуючи адсорбційну та молекулярно-ситову хроматографію на макропористих сорбентах (МПС).

Висока чутливість і специфічність способу з використанням методу імуноферментного аналізу (ІФА) досягається при використанні очищених від сторонніх білків концентрованих антигенів, правильно підібраних параметрів тест-системи, а саме: сенсibilізуючої дози антигену, рН інкубаційного буферного розчину, часу та температури адсорбції антигену на твердофазному носії.

Набір містить полістироловий мікропланшет, сенсibilізований очищеним антигеном вірусу грипу коней, сироватку крові позитивну до вірусу грипу коней, сироватку крові негативну, антивидовий

імунопероксидазний кон'югат та індикаторну систему (ортофенілєндіамін).

Використання набору для виявлення антитіл до вірусу грипу коней методом імуноферментного аналізу.

У лунки планшета, що сенсibilізований грипоznим антигеном (ряд А) вносять по 0,1 мл позитивної, (ряд В) негативної до грипу та у (ряди С,В,Е,Р,О,Н) дослідної сироватки крові коней. Потім їх розтитровують методом подвійних розведень, інкубують у термостаті 1 годину при температурі 37°C . Після цього планшет відмивають твін-фосфатно-буферним розчином (ТФБР) та вносять по 0,1 мл антивидового імунопероксидазного кон'югату, знову інкубують 1 годину при 37°C і знову відмивають ТФБР та вносять субстратний розчин (ортофенілєндіамін), спостерігають за забарвленням ферментативної реакції. При досягненні забарвлення позитивного контролю реакцію зупиняють додаванням до кожної лунки по 30-35 мкл 1М HCL, після чого проводять облік реакції за допомогою автоматичного спектрофотометра або візуально по інтенсивності забарвлення ферментативної реакції. При обліку реакції ІФА на спектрофотометрі, якщо показник оптичної щільності вище 0,17 - реакція позитивна.

Експериментальні дослідження, які проведені з використанням більше 600 проб сироваток крові коней, показали, що при використанні розробленого способу з набором діагностиків для ІФА є високочутливим, специфічним, тривалість дослідження 2-3 години; використання набору дає можливість проводити масові обстеження конярських господарств з лікувально-профілактичною метою. Спосіб постановки реакції з використанням набору автоматизований, мало трудомісткий.

Таким чином розроблений спосіб виявлення специфічних антитіл до вірусу грипу коней методом імуноферментного аналізу, з використанням розробленого набору діагностиків, дає можливість за 2-3 години провести діагностику захворювання тварин на грип, реакція високочутлива, специфічна, облік реакції автоматизований, може застосовуватись при масових діагностичних обстеженнях господарств.

Корисна модель знайде застосування у виробничих лабораторіях ветеринарної медицини, та науково-дослідних установах, при проведенні оздоровчих заходів від грипу коней.