



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **65903** (13) **U**  
(51) МПК (2011.01)  
G01N 33/00ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) ДІАГНОСТИЧНИЙ АНТИРАБІЧНИЙ ФЛОУРЕСЦЕНТНИЙ ІМУНОГЛОБУЛІН (ДАФІ)**

1

2

(21) u201011872

(22) 07.10.2010

(24) 26.12.2011

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) НЕСТЕРЕНКО ТЕТЯНА ГРИГОРІВНА

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДА-  
ЛЬНІСТЮ "АЛТЕКС"(57) Спосіб отримання діагностичного антирабіч-  
ного флуоресцентного імуноглобуліну (ДАФІ), який  
включає наступні технологічні процеси: виділення  
імуноглобулінів класу G з гіперімунної сироватки,

мічення імуноглобулінів G гіперімунної антирабіч-  
ної сироватки флуорохромом та виготовлення  
тест-препаратів, який **відрізняється** тим, що виді-  
лення імуноглобулінів класу G з гіперімунної сиро-  
ватки проводиться при 2-4 °C за допомогою сірча-  
нокислого амонію, при цьому суміш перемішують  
на мішалках, а потім центрифугують, осад розчи-  
няють фізіологічним розчином і центрифугують з  
наступною діалізацією для видалення сірчанокис-  
лого амонію.

Галузь техніки, до якої належить корисна мо-  
дель: ветеринарна медицина, біотехнологічна  
промисловість, а саме до визначення антигену  
вірусу сказу у мазках-відбитках головного мозку  
тварин реакцією прямої імунофлуоресценції  
(РПІФ).

Відомий імуноферментний діагностикум для  
визначення специфічних антитіл проти вірусу ска-  
зу, що включає аналіз сироваток крові на наяв-  
ність антитіл до вірусу сказу та визначення рівня  
напруженості імунітету. При цьому очищення та  
концентрування антигену проводять за допомогою  
поліетиленіміну, застосовують референс-  
сироватку під час визначення напруженості імуні-  
тету вакцинованих проти сказу тварин у міжнарод-  
них одиницях, тестують лише одне розведення  
досліджуваної сироватки, використовують реком-  
бінантний білок А помічений пероксидазою (патент  
України № 64544 А).

Недоліком відомого діагностикуму є те, що він  
не дає можливість ідентифікувати безпосередню  
вірус сказу у патологічному матеріалі.

Корисна модель ставить задачу розробки діаг-  
ностичного антирабічного флуоресцентного імуно-  
глобуліну (ДАФІ) на основі реакції прямої імуноф-  
луоресценції (РПІФ) для визначення антигену  
вірусу сказу у мазках-відбитках головного мозку  
тварин. Який є точним, швидким та порівняно де-  
шевим у виконанні з існуючих методів діагностики  
сказу.

Поставлена задача вирішується тим, що діаг-  
ностичний антирабічний флуоресцентний імуног-

лобулін (ДАФІ) включає наступні технологічні про-  
цеси:

1. Виділення імуноглобулінів класу G з гіпері-  
мунної сироватки;

2. Мічення імуноглобулінів G гіперімунної ан-  
тирабічної сироватки флуорохромом;

3. Виготовлення тест-препаратів.

Приклад 1. Виділення імуноглобулінів класу G  
з гіперімунної сироватки проводиться при 2-4 °C за  
допомогою сірчанокислого амонію. Суміш обереж-  
но перемішується на мішалках, а потім центрифугу-  
ється. Осадок розчиняється фізіологічним роз-  
чином і центрифугується. Потім діалізується для  
видалення сірчанокислого амонію.

Проводиться кон'югація імуноглобулінів з на-  
ступною очисткою флуоресцеїнізотіоціанат-  
імуноглобулінів від флуорохрома, що не зв'язався,  
гельфільтрацією. За допомогою реакції прямої  
імунофлуоресценції визначається активність та  
специфічність антирабічних флуоресцеїнізотіоціан-  
ат-імуноглобулінів.

Виготовлення тест-препаратів. В парні ряди  
лунок 96-луночної панелі з однодобовою клітин-  
ною культурою ПС вноситься підтримуюче сере-  
довище MEM із штабом CVS (позитивний тест-  
препарат). Клітини інкубують (37±0,5) °C в умовах  
95 %-вої вологості та 5 %-го вмісту CO<sub>2</sub> протягом  
72 годин. Потім середовище для культивування із  
лунок видаляється і клітинний моношар фіксується  
формаліном або ацетоном. Пластини промива-  
ються ФСБ, висушуються на повітрі.

(13) **U**  
(11) **65903**  
(19) **UA**

Приклад 2. Діагностичний антирабічний флуоресцентний імуноглобулін (ДАФІ) готують по прикладу 1. Проведення випробування в культуральних тест-препаратах. У вертикальні ряди лунок вносять по 0,1 см<sup>3</sup> флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінів у розведеннях 1:2-1:32 (на кожне розведення антирабічних флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінів використовують по 2 позитивних і негативних лунок), нанесені розведення кон'югата витримують при (37±0,5)°C протягом 30 хв. Потім препарати відмивають від флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінів, що не зв'язалися, або неспецифічно зв'язалися, протягом 20 хв у темному місці, змінюючи буферний розчин через кожні 5 хв.

По закінченні відмивання мікропанелі обполісують дистильованою водою та проводять мікроскопію з використанням інвертованого люмінесцентного мікроскопа (Olympus, Японія).

Облік і оцінка результатів

Облік результатів проводять по оцінці інтенсивності світіння

++++ - яскраве, блискуче жовто-зелене світіння;

+++ - чітко виражене яскраве жовто-зелене світіння;

++ - неяскраве світіння жовто-зеленого кольору;

+ - слабе світіння, що виявляється у великих включеннях зелено-сірого кольору.

Активність: антирабічні флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобуліни вважають активними при наявності в позитивних тест-препаратах, які оброблені флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінами в розведенні 1:16 специфічного зеленого світіння з оцінкою інтенсивності флуоресценції на один-два хресто-"цвітний" титр. Робочим розведенням флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінів вважають подвійний хресто-"цвітний" титр, при якому виявляють яскраве жовто-зелене світіння цитоплазми клітин позитивних тест-препаратів з інтенсивністю на три-чотири хрести. Робоче розведення антирабічних флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінів повинно бути не менш 1:8.

Специфічність: діагностиками вважаються специфічними при виявленні в позитивних тест-препаратах, які оброблені флуоресцеїнізотіоціанат-імуноглобулінами в робочому розведенні, специфічного яскраво-зеленого світіння цитоплазми кліток. У негативних тест-препаратах виявляють тьмяну сіро-зелену флуоресценцію цитоплазми клітин.