



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **67896** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G01N 33/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2011 09474	(72) Винахідник(и):	Кривошия Павло Юрійович (UA), Мандигра Микола Станіславович (UA), Андріяш Ріта Юріївна (UA)
(22) Дата подання заявки:	28.07.2011	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ЕПІЗООТОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК, вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	12.03.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.03.2012, Бюл.№ 5		

(54) СПОСІБ ТЕХНІКИ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦІЇ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ ТА РЕАКЦІЇ ГАЛЬМУВАННЯ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб техніки постановки реакції гемаглютинації та реакції гальмування гемаглютинації включає взяття крові, її відмивання та відбір еритроцитів відповідної концентрації. Для визначення робочої дози еритроцитів проводять їх титрацію в 96-лункових планшетах для постановки імунологічних реакцій.

UA 67896 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, зокрема до способів техніки постановки реакції гемаглютинації (РГА) та гальмування гемаглютинації (РГГА) при визначенні антитіл чи збудника при інфекційних захворюваннях тварин.

Реакція гемаглютинації використовується для визначення вмісту вірусів в різних біологічних об'єктах (кров, тканини, клітинна фракція культур клітин тощо), суть її полягає в тому, що деякі віруси здатні аглютинувати еритроцити завдяки наявності у них аглютиногенів, за допомогою яких проходить аглютинація (склеювання) еритроцитів та утворення характерного осаду.

Про специфічність вірусної гемаглютинації роблять висновок за ефектом гальмування або пригнічення її відповідними противірусними антитілами. Це явище лежить в основі РГГА. Механізм РГГА полягає в тому, що противірусні антигемаглютиніни перешкоджають вірусам аглютинувати еритроцити чутливих видів тварин. РГГА застосовують у вірусології для ідентифікації гемаглютинуючих вірусів, серологічної діагностики вірусних інфекцій (за приростом титру антитіл або за роздільним визначенням Ig M та Ig G) та контролем рівня імунітету за масових екологічних дослідженнях.

Загальноприйнятою технікою постановки РГА та РГГА є приготування суміші еритроцитів відповідної концентрації, визначення робочої дози вірусу та постановка самої реакції. Після проведення відповідних обробок еритроцитів готують їх робочу концентрацію. Так, одні автори вказують на використання її в межах 0,75-1 % (Руководство по лабораторной диагностике вирусных и риккетсиозных болезней / Под. ред. П.Ф. Здроводского и проф. М.И. Соколова - М.: Издательство "Медицина", 1965. - С. 140). Інші 0,25-1 % (Посібник з медичної вірусології.// За ред. В.М. Гиріна - К.: Здоров'я, 1995. - С.117), 0,5-1 % (Диагностика вирусных болезней животных: Справочник /В.Н. Сюрин, Р.В.Белоусова, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991. - 528 с.). Необхідно відзначити, що від вибору оптимальної робочої дози еритроцитів при проведенні даних реакцій залежить досить суттєво чутливість виявлення вмісту вірусів чи антитіл. З наведених літературних даних концентрація еритроцитів при використанні в реакціях суттєво відрізняється. Автори підбирають концентрацію еритроцитів, спираючись на результати інших. Вибір концентрації залежить від видової належності тварини, від попередньо проведених обробок за стабілізації та строків зберігання в консерванті.

Ми поставили задачу розробити спосіб, який би дав змогу перед проведенням РГА та РГГА визначити оптимальну концентрацію та придатність до використання еритроцитів, незважаючи на їх походження та строки зберігання.

Поставлена задача вирішується так: спосіб техніки постановки реакції гемаглютинації та реакції гальмування гемаглютинації, який включає взяття крові, її відмивання та відбір еритроцитів відповідної концентрації, відрізняється тим, що для визначення робочої дози еритроцитів проводять їх титрацію в 96-лункових планшетах для постановки імунологічних реакцій.

Спосіб здійснюється так: кров беруть в асептичних умовах з вени тварин в пробірки з антикоагулянтном (трилон Б, гепарин, лимоннокислий натрій та ін.). Після цього проводять осадження еритроцитів крові шляхом центрифугування з прискоренням у 200g. Надосад після центрифугування зливають, а осад еритроцитів відмивають фізіологічним розчином до отримання прозорої рідини над осадом еритроцитів. Осад еритроцитів в об'ємі 0,025см³ відбирають автоматичним мікродозатором і переносять в 96-лунковий планшет для постановки імунологічних реакцій, де попередньо додано в лунки по 0,025 см³ фізіологічного розчину. Осад еритроцитів з першої лунки переносять в об'ємі 0,025 см³ за допомогою дозатора в другу, де знову змішують і переносять в об'ємі 0,025 см³ в третю і т. д. Так послідовно отримують дворазове розведення осаду еритроцитів (1:2, 1:4, 1:8 і т.д.). Після приготування розведень еритроцитів планшета струшують і залишають при кімнатній температурі. Облік результатів проводять залежно від швидкості осідання еритроцитів на дно лунки та формування чіткого осаду у вигляді кола з рівними межами. Візуально визначають, при якому максимальному розведенні еритроцитів сформовано чітке коло. В подальшому при проведенні реакцій використовують розведення еритроцитів, визначене шляхом титрування.

Результати доводять, що проведені дослідження на виявлення збудників захворювань та антитіл у плазмі крові тварин при використанні визначеної робочої концентрації еритроцитів шляхом їх титрування дозволяють зменшити витрати часу та збільшити чутливість реакції РГА та РГГА для визначення вмісту збудника захворювання та антитіл і за короткий час поставити діагноз.

Враховуючи значну роль серологічних досліджень у постановці остаточного діагнозу при тому чи іншому інфекційному захворюванні, стандартизація та оптимізація виробничого процесу, підвищення чутливості реакції та скорочення часу на серологічні дослідження ставить цей спосіб в ряд вагомих внесків у галузі ветеринарної вірусології.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб техніки постановки реакції гемаглютинації та реакції гальмування гемаглютинації, що включає взяття крові, її відмивання та відбір еритроцитів відповідної концентрації, який **відрізняється** тим, що для визначення робочої дози еритроцитів проводять їх титрацію в 96-лункових планшетах для постановки імунологічних реакцій.

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601