



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **69021**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/535** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 08665**

(22) Дата подання заявки: **11.07.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.04.2012**

(46) Публікація відомостей **25.04.2012, Бюл.№ 8**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Ситюк Микола Петрович (UA),**

**Муштук Ірина Юріївна (UA),**

**Чехун Артем Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

**НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ**

**НАУК УКРАЇНИ,**

вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)

## (54) МОДИФІКОВАНИЙ СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ ФЛЮОРЕСЦІЮЮЧИХ АНТИТІЛ

### (57) Реферат:

Модифікований спосіб діагностики класичної чуми свиней з використанням флюоресціюючих антитіл включає приготування мазків-відбитків патологічного матеріалу і їх фіксацію, фарбування клітин мазків-відбитків ФІТЦ-імуноглобуліном проти вірусу КЧС, виявлення клітин, уражених вірусом класичної чуми свиней. Мазки-відбитки патологічного матеріалу та наступні етапи постановки реакції (фіксація клітин 70 % етиловим спиртом, внесення специфічних ФІТЦ-імуноглобулінів проти вірусу КЧС, відмивання мазків-відбитків фосфатно-буферним розчином) проводять виключно у лунках пластикового планшета. Виявлення уражених вірусом КЧС клітин в мазках-відбитках здійснюють за допомогою інвертованого люмінесцентного мікроскопа зі специфічним забарвленням цитоплазми в яскраво-зелений колір.

**UA 69021 U**



Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, зокрема для індикації вірусу класичної чуми свиней в біологічному матеріалі (шматочки органів).

Аналог корисної моделі: [Рекомендації по діагностиці класичної чуми свиней методом імунофлюоресценції, затверджений Держ. департаментом ветеринарної медицини 28 грудня 1998 р. Реєстраційний № 15-14/307.]

Приготування препаратів мазків-відбитків та їх фіксація.

Для приготування препаратів використовують органи і тканини, з яких готують мазки-відбитки на знежирених спирт-ефіром покривних скельцях, які закріплюють в розщеплених паличках сірників з умовними номерами проб органів, послідовно прикладаючи покривне скло до поверхні зрізу досліджуваного органу. Із кожної проби готують по 4 мазки-відбитки. Препарати підсушують при кімнатній температурі (5-10 хв) і фіксують хімічно чистим ацетоном 10 хв. при -20 °С.

Фарбування препаратів.

ФІТЦ-імуноглобуліни КЧС для обробки препаратів використовують в робочому розведенні, яке вказане на етикетці ампули. Для цього сухий ФІТЦ-імуноглобулін розчиняють в дистильованій воді до об'єму, який вказаний на етикетці ампули. Препарати після фіксації ацетоном для вилучення його залишків витримують 3-5 хвилин при кімнатній температурі. Потім кладуть мазком-відбитком вниз на краплі флюоресціюючих глобулінів, які наносять на чисті знежирені предметні скельця. При цьому покривні скельця із сірниками розміщують так, щоб нижня поверхня з мазком-відбитком занурилась у флюоресцентний реактив. Фарбування проводять у вологій камері (ексикаторі) при +37 °С протягом 30 хвилин. Далі поступово пластинки знімають з предметних скелець і вільними кінцями сірників закріплюють в гніздах пінопластових штативів, які перевертають вниз та опускають в посудину із забуферним фізіологічним розчином рН 7,2-7,5, встановленим на магнітній мішалці. Відмивання проводять в плаваючому стані штативу з препаратами протягом 20 хвилин в темному місці при одноразовій зміні розчину через 10 хвилин. Після промивання препарати споліскують дистильованою водою і підсушують в темному місці. Далі препарати поміщають у забуферний гліцерин для флюоресцентної мікроскопії. Для цього на знежирені предметні скельця наносять краплі забуферного гліцерину для флюоресцентної мікроскопії, кладуть на них покривні скельця мазками донизу та заливають краї розплавленим парафіном. Мікроскопію проводять у відображеному синьому світлі на люмінесцентних мікроскопах при малому і середньому збільшенні під імерсійною системою, використовуючи імерсійну олію або гліцерин. Антиген вірусу КЧС в мазках-відбитках, оброблених специфічним кон'югатом, знаходять по смарагдовому або яскраво-зеленому світінню цитоплазми клітин. Виявлення специфічного світіння в цитоплазмі навіть в окремих клітинах препаратів, одержаних від підозрілих в захворюванні тварин, слід вважати позитивним результатом.

Але цей спосіб має недоліки: виготовлення мазків-відбитків патологічного матеріалу на покривних скельцях є незручним, так як останні крихкі, небезпечні для дослідника; фіксація препаратів чистим ацетоном призводить до зморщення клітин, із-за властивості випаровуватись ацетон має токсичний вплив на органи дихання; проведення мікроскопії препаратів потребує спеціальної затемненої люмінесцентної кімнати, що виключає повну безпеку присутності науковців під час дослідження.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу діагностики класичної чуми свиней з використанням специфічних флюоресціюючих антитіл, шляхом застосування пластикових планшет (замість покривних скелець), 70 % етилового спирту замість ацетону, та мікроскопії препаратів під інвертованим люмінесцентним мікроскопом, замість звичайного люмінесцентного, що дозволяє проводити модифіковану діагностику класичної чуми свиней, зі скороченням часу постановки реакції.

Поставлена задача вирішується тим, що модифікований спосіб діагностики класичної чуми свиней з використанням флюоресціюючих антитіл включає підготовку мазків-відбитків патологічного матеріалу і їх фіксацію, фарбування клітин в мазках-відбитках та виявлення клітин уражених вірусом класичної чуми свиней. Мазки-відбитки патологічного матеріалу готуються у лунках пластикового планшета, фіксація здійснюється 70 % етиловим спиртом, з внесенням робочого розведення ФІТЦ-імуноглобуліну проти вірусу КЧС, а виявлення уражених клітин здійснюється за допомогою інвертованого люмінесцентного мікроскопу із специфічним забарвленням цитоплазми уражених клітин смарагдовим або яскраво-зеленим кольором.

Процес постановки реакції полягає в наступному: ножицями проводиться зріз біологічного матеріалу органів і тканин (лімфатичні вузли, нирки, селезінка, легені) розміром 0,4-0,5 на 0,4-0,5 см, з якого дотиком до фільтрувального паперу видаляється наявна рідина. Мазки-відбитки готуються шляхом легкого доторкання до поверхні дна лунок пластикового плоскодонного

планшета поверхню зрізу шматочка досліджуваного органу за допомогою очного пінцету. З одного досліджуваного органу готуються 4 послідовних мазків-відбитків в кожній окремій лунці планшета. Фіксацію мазків-відбитків проводять в кожній лунці планшета з внесенням автоматичною піпеткою по 0,15 см<sup>3</sup> 70 % етилового спирту з експозицією протягом 15 хвилин, після чого останній зливають у ємкість, а залишок видаляється шляхом обережного повільного струшування. Далі планшет залишається на 5-10 хвилин при кімнатній температурі для підсихання. Фарбування мазків-відбитків проводиться безпосередньо в лунках планшета з внесенням по 0,4-0,5 мкл ФІТЦ- імуноглобуліну проти вірусу КЧС в робочому розведенні, з експозицією 30 хв. Робоче розведення ФІТЦ-імуноглобуліну готується розчиненням його у дистильованій воді до об'єму, який вказаний на етикетці ампули. Відмивання проводиться 3-5-разово фосфатно-буферним рН 7,2-7,4 розчином. Далі пластиковий планшет обережно піддається струшуванню та підсушується на фільтрувальному папері протягом 15-20 хвилин. Мікроскопія проводиться під інвертованим люмінесцентним мікроскопом при збільшенні об'єктива 10/0,25 Ph або 20/0,45 шляхом проглядання кожної лунки планшета. Клітини уражені вірусом КЧС в мазках-відбитках, оброблених специфічним ФІТЦ-імуноглобуліном, знаходять по смарагдовому або яскраво-зеленому світінню цитоплазми. Виявлення специфічного світіння в цитоплазмі навіть в окремих клітинах препаратів, одержаних від підозрілих в захворюванні тварин, вважається позитивним результатом.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Модифікований спосіб діагностики класичної чуми свиней з використанням флюоресціюючих антитіл, який включає приготування мазків-відбитків патологічного матеріалу і їх фіксацію, фарбування клітин мазків-відбитків ФІТЦ-імуноглобуліном проти вірусу КЧС, виявлення клітин, уражених вірусом класичної чуми свиней, який **відрізняється** тим, що мазки-відбитки патологічного матеріалу та наступні етапи постановки реакції (фіксація клітин 70 % етиловим спиртом, внесення специфічних ФІТЦ-імуноглобулінів проти вірусу КЧС, відмивання мазків-відбитків фосфатно-буферним розчином) проводять виключно у лунках пластикового планшета, а виявлення уражених вірусом КЧС клітин в мазках-відбитках здійснюють за допомогою інвертованого люмінесцентного мікроскопа зі специфічним забарвленням цитоплазми в яскраво-зелений колір.

---

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

---

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