



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77258** (13) **U**
(51) МПК
C12Q 1/70 (2006.01)
C12R 1/93 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 08046	(72) Винахідник(и): Кривошия Павло Юрійович (UA), Кот Леся Богданівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 02.07.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.02.2013	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ЗАХІДНОГО ПОЛІССЯ НААН, вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.02.2013, Бюл.№ 3	

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ВІРУСУ ГРИПУ КОНЕЙ НА ОСНОВІ МІКРОМЕТОДУ БЛЯШКОУТВОРЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб визначення кількісного вмісту вірусу грипу коней на основі мікрометоду бляшкоутворення включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин. Потім здійснюють заливку моношару агаровим покриттям, що проявляється утворенням бляшок. При цьому використовують 96-лункові планшети і автоматичні дозатори зі змінними наконечниками.

UA 77258 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної вірусології, зокрема до способів визначення кількості вірусу грипу коней на основі мікрометоду на бляшкоутворення і може бути використана в роботі діагностичних та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

У процесі репродукції вірусів у живих системах виникають зміни, що дають змогу виявити вірус та визначити якісно і кількісно його інфекційну активність. До специфічних змін у культурах клітин належить бляшкоутворення. Це здатність вірусів у присутності поживного покриття до локального розмноження у клітинній культурі з наступним руйнуванням сусідніх клітин і формування у моношарі дефектів-вірусних бляшок. Кожна бляшка формується як результат розмноження однієї вірусної частки та відповідає одній бляшкотвірній одиниці (БТО) інфекційної активності вірусу.

Метод бляшкоутворення широко застосовують у вірусологічній практиці для: а) точної кількісної оцінки вмісту вірусів у матеріалі; б) вивчення та оцінки реакції вірусів на фізико-хімічні впливи; в) типізування вірусів у реакції нейтралізації за ефектом пригнічення бляшкоутворення (редукція бляшок); г) одержання чистих ліній (клонування вірусів); д) вивчення генетичних ознак вірулентності (маркер величина бляшок і т.д.).

У загальноприйнятій технологічній процес титрування вірусів у культурах клітин за бляшкоутворенням під агаровим покриттям входить приготування серійних розведень вірусу з інтервалом 0,5 або 1 lg у розчині Хенкса, зараження відмитих моношарів у флаконах з-під пеніциліну або в чашках Петрі розведеннями вірусу, інкубація їх при температурі 37 °С протягом 60 хвилин, видалення вірусвмісної рідини та заливки моношару агаровим покриттям при температурі 37 °С, підрахунок кількості утворених вірусами бляшок на 3-тю - 7-му добу за формулою:

$$X = \frac{A \times B}{C}$$

де X - число БТО/см³ (БТО - бляшкотвірні одиниці); A - середня кількість бляшок у розведенні вірусу; B - розведення вірусу; C - об'єм вірусвмісного матеріалу (Діагностика вирусных болезней животных: Справочник /В.Н. Сюрін, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина.-М.: Агропромиздат, 1991. - 527 с. Посібник з медичної вірусології; за редакцією В.М. Гиріна. - Київ: Здоров'я, 1995. - 367 с).

Недоліком цього способу є те, що для свого застосування він потребує значної кількості компонентів реакції, посуду, що перешкоджає масовим діагностичним дослідженням.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб визначення кількісного вмісту вірусу грипу коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, який в десять раз скорочує витрати реагентів та полегшує постановку методу.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб визначення кількісного вмісту вірусу грипу коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, що включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин та заливкою моношару агаровим покриттям, що проявляється утворенням бляшок при наявності вірусу в культурі клітин, згідно з корисною моделлю, використовують 96-лункові планшети і автоматичні дозатори зі змінними наконечниками для зменшення витрат реагентів, часу, праці, а також робить реакцію більш чутливою і специфічною.

Спосіб постановки мікрометоду бляшкоутворення для визначення кількісного вмісту вірусу грипу коней здійснюється наступним чином.

Для проведення досліджень готують 10-разові розведення вірусвмісного матеріалу, кожне з яких в об'ємі 0,2 см³ вносять у лунки планшета з культурами клітин.

Перед інфікуванням із лунок плашок з культурами клітин видаляють середовище росту і вносять по 0,2 см³ вірусвмісного матеріалу. На одне розведення вірусу використовують 4 лунки з культурами клітин. Інкубацію вірусвмісного матеріалу проводять при температурі 37 °С протягом 2-х годин. Після інкубації суміш вірусу видаляють та заливають агаровим покриттям. Культуру клітин інкубують при температурі 37 °С в термостаті протягом 7 днів.

Кількість бляшок підраховують на 3-тю - 7-му добу. Для контролю культури клітин чотири лунки планшета вірусом не заражають, а після вилучення живильного середовища заливають агаровим покриттям. Титр вірусу грипу виражають у БТО на 1 см³ вірусвмісного матеріалу.

Експериментальні дослідження, проведені в лабораторії Інституту сільського господарства Західного Полісся НААН, показали, що визначення кількісного вмісту вірусу грипу на основі мікрометоду бляшкоутворення є високочутливим, а сам спосіб постановки не є трудомістким. Користуючись цим способом, можна проводити масові дослідження щодо оцінки кількісного вмісту вірусів у матеріалі, вивчення та оцінки реакції вірусів на фізико-хімічні впливи типізування

вірусів у реакції нейтралізації за ефектом пригнічення бляшкоутворення (редукція бляшок) і т.д. зі значною економією антигену та середовищ.

Запропонований спосіб знайде застосування у вірусологічних лабораторіях ветеринарної медицини та науково-дослідних установах.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб визначення кількісного вмісту вірусу грипу коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, що включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин та залиттям моношару агаровим покриттям, що проявляється утворенням бляшок при наявності вірусу в культурі клітин, який **відрізняється** тим, що використовують 96-лункові планшети і автоматичні дозатори зі змінними наконечниками для зменшення витрат реагентів, часу, праці, а також робить реакцію більш чутливою і специфічною.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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