



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **77600** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C12Q 1/70** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 08031</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Кривошия Павло Юрійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>02.07.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.02.2013</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ІНСТИТУТ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ЗАХІДНОГО ПОЛІССЯ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Князя Володимира, 16/18, м. Рівне, 33028 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.02.2013, Бюл.№ 4</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ АНЕМІЇ КОНЕЙ НА ОСНОВІ МІКРОМЕТОДУ БЛЯШКОУТВОРЕННЯ**

**(57) Реферат:**

Спосіб визначення кількісного вмісту вірусу інфекційної анемії коней на основі мікрометоду бляшкоутворення включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин та залиття моношару агаровим покриттям, при цьому використовують 96-лункові планшети і автоматичні дозатори зі змінними наконечниками.

UA 77600 U



Корисна модель належить до галузі ветеринарної вірусології, зокрема до способів визначення кількості вірусу інфекційної анемії 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/см<sup>3</sup> (БТО - бляшкотвірні одиниці);  $A$  - середня кількість бляшок у розведенні вірусу;  $B$  - розведення вірусу;  $C$  - об'єм вірусвмісного матеріалу (Диагностика вирусных болезней животных: Справочник / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. - М.: Агропромиздат, 1991.-527 с. Посібник з медичної вірусології; за редакцією В.М. Гиріна. - К.: 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 інфекційної анемії коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, який в десять разів скорочує витрати реагентів та полегшує постановку методу.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб визначення кількісного вмісту вірусу інфекційної анемії коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, що включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин та заливки 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, та набуття реакцією більшої чутливості і специфічності.

Спосіб постановки мікрометоду бляшкоутворення для визначення кількісного вмісту вірусу інфекційної анемії коней здійснюється наступним чином. Для проведення досліджень готують 10-разові розведення вірусвмісного матеріалу, кожне з яких в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup> вносять у лунки планшета з культурами клітин.

Перед інфікуванням із лунок плашок з культурами клітин видаляють середовище росту і вносять по 0,2 см<sup>3</sup> 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 інфекційної анемії виражають у БТО на 1 см<sup>3</sup> вірусвмісного матеріалу.

Експериментальні дослідження, проведені в лабораторії Інституту сільського господарства Західного Полісся НААН, показали, що визначення кількісного вмісту вірусу інфекційної анемії 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 інфекційної анемії коней на основі мікрометоду бляшкоутворення, що включає зв'язування вірусу з чутливою моношаровою культурою клітин та заливття 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, та набуття реакцією більшої чутливості і специфічності.

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

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