



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 116389

(13) U

(51) МПК

G01N 33/535 (2006.01)

A61K 39/187 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2016 06962	(72) Винахідник(и):	Ситюк Микола Петрович (UA), Галка Ігор Васильович (UA), Спиридонов Владислав Геннадієвич (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки:	29.06.2016	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.05.2017		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.05.2017, Бюл.№ 10		

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ФІТЦ-ІМУНОГЛОБУЛІНІВ ДЛЯ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОЇ ДІАГНОСТИКИ АФРИКАНСЬКОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб одержання специфічних ФІТЦ-імуноглобулінів для імунофлюоресцентної діагностики африканської чуми свиней призначений для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних органів - селезінка, лімфатичні вузли тощо) уражених вірусом африканської чуми свиней клітин, шляхом приготування мазків-відбитків та їх фарбування специфічними ФІТЦ-імуноглобулінами, який включає імунізацію кролів, виділення фракції імуноглобулінів, кон'югацію імуноглобулінів з флуоресциїнізотіоціанатом (ФІТЦ), хроматографічне очищення, фасування і ліофілізацію та перевірку на специфічність з обліком результатів дослідження під люмінесцентним мікроскопом. Використовується з метою діагностики африканської чуми у свійських і диких свиней, одержання імуноглобулінів класу G здійснюється на рекомбінантний білок вірусу АЧС рK205R, а облік результатів досліджень проводиться під інвертованим світловим мікроскопом.

UA 116389 U

Галузь техніки до якої належить корисна модель: ветеринарна вірусологія, зокрема, для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних органів - селезінка, лімфатичні вузли тощо) уражених вірусом африканської чуми свиней клітин, шляхом приготування в мазків-відбитків та їх фарбуванням специфічними ФІТЦ-імуноглобулінами.

У світовій практиці для діагностики африканської чуми свиней в лабораторних умовах використовуються наступні методи: реакція гемадсорбції (РГАд), метод флуоресціюючих антитіл (МФА), твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), імунопероскидазний тест (NPLA) та полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Одним зі специфічних у разі виявлення антигену вірусу є метод флуоресціюючих антитіл, визначення інфекційної активності цирковірусу другого типу є метод флуоресціюючих антитіл, який в Україні не розроблений. Аналог корисної моделі.

Рекомендації по діагностиці класичної чуми свиней методом імуофлуоресценції, затверджений Держ. департаментом ветеринарної медицини 28 грудня 1998 р. Реєстраційний № 15-14/307 [1].

1. 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 органа. 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.

2. 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 флуоресціюючих глобулінів, які наносять на чисті знежирені предметні скельця. При цьому покривні скельця із сірниками розміщують так, щоб нижня поверхня з мазком-відбитком занурилась у флуоресцентний 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, встановлену на магнітній мішалці. Відмивання проводять в плаваючому стані штатива 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 флуоресцентної мікроскопії. Для цього на знежирені предметні скельця наносять краплі забуферного гліцерину для флуоресцентної 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.

Даний аналог взято, як найближчий прототип.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити вітчизняні специфічні ФІТЦ-імуноглобуліни для імуофлуоресцентної діагностики африканської чуми свиней з метою виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних органів - селезінка, лімфатичні вузли тощо) уражених вірусом африканської чуми свиней клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що виготовлення специфічних ФІТЦ-імуноглобулінів для імуофлуоресцентної діагностики АЧС складається з 6 етапів: імунізації кролів, виділення фракції імуноглобулінів, кон'югації імуноглобулінів з флуоресцінізотіоціанатом (ФІТЦ), хроматографічного очищення, фасування і ліофілізації та перевірки на специфічність. В цьому разі, передбачено дві контрольні відправні точки: Перша точка - контроль за титром антитіл

після імунізації кролів рекомбінантним антигеном-аналогом рK205R вірусу АЧС; друга точка - контроль за ефективністю кон'югації ФІТЦ з імуноглобулінами.

Процес постановки мікрометоду реакції нейтралізації для виявлення специфічних гуморальних антитіл проти вірусу хвороби Ауескі полягає в наступному.

5 Як антиген для імунізації лабораторних тварин використовують комерційний рекомбінантний препарат рK205R, виробництва "LT-Biotech" (Литва).

10 Згідно з літературними даними саме цей антиген рK205R є одним із перспективних кандидатів для серологічної діагностики АЧС. В роботах деяких авторів [2; 3] показано, що саме цей протеїн є маркером ранньої інфекції (експресія починається з четвертої години після інфекції), має високим імунологічним потенціалом (титр антитіл виявляється на сьому добу після інфікування), є достатньо консервативним серед різних штамів вірусу АЧС (порівняно з іншими антигенами) та характеризується високими показниками чутливості та специфічності в імуноферментному аналізі (91 та 99 %, відповідно).

15 Рекомбінантним антигеном-аналогом вірусу АЧС рK205R імунізують двох лабораторних кролів масою тіла $2,0 \pm 0,2$ кг, яким на першу, 14-ту, 28-му, 42-гу; 56-ту доби вводять по 2,0 мг антигену з повним ад'ювантом Фрейнда (1:1) внутрішньом'язово. На 70-ту добу - отримують специфічну поліклональну сироватку крові і досліджують за титром антитіл імуноферментним аналізом.

20 Рекомбінантний антиген-аналог вірусу АЧС рK205R розводять 0,05 М карбонатним буфером (рН 9,5) та вносять в лунки полістиролового планшета Maxi Sorb (Nunk) у кількості $10,0 \text{ мкг/см}^3$ кожний. Планшет інкубують впродовж 16-18 год. за температури 4°C . Після інкубації планшет промивають декілька разів розчином для відмивання (0,02 М фосфатний буфер, 0,05 % Твін-20, рН 8,0). Досліджувані зразки сироваток крові кролів розводять у 50 разів розчином для відмивання та вносять в лунки планшета, інкубують за температури 37°C впродовж 60 хв. Після закінчення інкубації лунки планшета промивають розчином для відмивання та вносять в лунки імуноферментний кон'югат (rSPGP-пероксидаза хрому) [4] в робочому розведенні 1:32000. Інкубацію планшета з кон'югатом проводять впродовж 40 хв за температури 37°C . Лунки планшета знову ретельно відмивають та вносять забарвлюючий розчин хромогену тетраметилбензидин (Fluka). Після 20 хв інкубації планшета за кімнатної температури реакцію зупиняють, додаючи 0,5 М розчин сірчаної кислоти, та вимірюють ОГ за довжини хвилі 450 нм.

30 З сироватки виділяють сумарні імуноглобуліни класу G, які в подальшому мітять ФІТЦ. Реакція кон'югації ФІТЦ здійснюється між вільними аміногрупами протеїнів з утворенням стабільного тіосечовинного зв'язку. Імуноглобуліни класу G (IgG) висолюють з сироватки крові за допомогою солі сульфату амонію за 35 % насичення, згідно з загальноприйнятими умовами [5]. Осад імуноглобулінів зберігають в холодильнику за 4°C . Кон'югація IgG з ФІТЦ. Осад IgG розчиняють у дистильованій воді до концентрації 10 мг/см^3 та знесолюють методом ексклюзивної хроматографії на сефадексі G-75 (GE Healthcare Life Sciences) використовуючи хроматографічну систему Biologic LP (BioRad). Хроматографічний пік імуноглобулінів переводять у 0,67 М боратний буфер (рН 8,5), додають ФІТЦ (Calbiochem, Molecular biology grade) у співвідношенні (1:1 по масі) та інкубують годину за кімнатної температури у темряві. Після інкубації реакційну суміш піддають очищенню на сефадексі G-75. Характерний пік мічених ФІТЦ імуноглобулінів переводять у 0,02 М фосфатно-сольовий буфер, що містить 0,25 М NaCl та 0,1 % NaN_3 . Вимірюють ультрафіолетові спектри на спектрофотометрі BioSpec-Nano (Shimadzu) за довжини хвилі 280 та 494 нм.

45 Ефективність ковалентного приєднання ФІТЦ до IgG, виражають як молярне співвідношення ФІТЦ/IgG, або F/P та концентрацію мічених ФІТЦ імуноглобулінів підраховують за формулами [6; 7]:

$$F/P = \frac{2,77 \cdot x A_{495}}{A_{289} - (0,35 \times A_{495})^{**}},$$

$$IgG_{(mg/ml)} = \frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4^{***}},$$

50 * - константа для ФІТЦ-ZgG кон'югатів;

** - фактор корекції, так як ФІТЦ поглинає на 280 нм;

*** - оптична густина $IgG(A_{280})$ за концентрації 1,0 мг/мл.

Після визначення ефективності кон'югації ФІТЦ з імуноглобулінами та концентрації мічених антитіл до препарату додають 10-кратну кількість бичачого сироваткового альбуміну (Sigma-

Aldrich), розфасовували по 0,5-1,0 см³ у скляну тару, заморожують за температури -80 °С та ліофільно висушують у вакуумній сушильній шафі Telstar Cryodos.

Після кон'югації ФІТЦ з IgG проводять хроматографічне очищення цільового продукту (кон'югат ФІТЦ-ZgG) від продуктів розпаду ФІТЦ, які не зв'язалися з IgG. Цільовий продукт збирають в окрему пробірку та проводили додатковий спектрофотометричний аналіз якості мічення антитіл ФІТЦ та кількості кінцевого препарату.

Розподіл продуктів реакції проводять на хроматографі Biologic LP (BioRad) із використанням матриці сефадекс G-75 (розмір колонки 20*500 мм, швидкість потоку 1 см³/хв). Пік А - цільовий продукт (кон'югат ФІТЦ-ZgG); пік В - кондуктивність потоку; пік С - продукти розпаду ФІТЦ, який не зв'язався із IgG. Праворуч шкала кондуктивності (mS/cm), ліворуч - ультрафіолетовий спектр 280 нм (оптичні одиниці).

Паралельно оцінюють спектрофотометричні характеристики ФІТЦ-імуноглобулінів АЧС після хроматографічного очищення на матриці сефадекс G-75. Після проведення обрахунку отримують показник співвідношення F/P. Рекомендований ефективний діапазон співвідношення F/P для ФІТЦ-Tg-G кон'югатів лежить в межах 4-7 [8] (рис. 3.61).

Одержаний продукт випробовують на предмет його специфічності у мазках-відбитках патологічного матеріалу від загиблених на африканську чуму диких свиней.

З патологічного матеріалу (лімфоїдні органи - селезінка, лімфатичні вузли) готують мазки-відбитки на поверхні предметних скелець (3-5 мазків на одному предметному склі). Висушують протягом 10-20 хвилин за кімнатної температури. Готують по 2 дублікати мазків-відбитків (один для перевірки вітчизняним препаратом, а інший - комерційним аналогом).

Вміст 3-х флаконів ФІТЦ-імуноглобулінів розчиняють стерильним фізіологічним розчином до початкового об'єму та витримують 5-хвилин з метою агрегації та повного розчинення висушеної маси та об'єднують. Готують його робоче розведення (1:10) та на кожне скельце з мазком-відбитком наносять 0,1 см³ готового розчину. Інкують у вологій камері в термостаті за 37 °С, протягом 1 години. Після інкубації скельця відмивають фосфатно-буферним розчином рН 7,2-7,4 тричі по 10 хвилин і 1 раз дистильованою водою та висушують.

Облік результатів випробування.

Проводять мікроскопію мазків-відбитків з використанням флуоресцентних мікроскопів (збільшення об'єктива ×20, ×40). Позитивний результат (наявність клітин уражених вірусом АЧС) яскраве забарвлення цитоплазми клітин (моноцити, макрофаги) зеленим кольором. Негативний результат - відсутність яскравого забарвлення цитоплазми клітин зеленим кольором.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання специфічних ФІТЦ-імуноглобулінів для імунофлуоресцентної діагностики африканської чуми свиней, призначений для виявлення в патологічному матеріалі (фрагменти лімфоїдних органів - селезінка, лімфатичні вузли тощо) уражених вірусом африканської чуми свиней клітин, шляхом приготування мазків-відбитків та їх фарбування специфічними ФІТЦ-імуноглобулінами, який включає імунізацію кролів, виділення фракції імуноглобулінів, кон'югацію імуноглобулінів з флуоресцінізотіоціанатом (ФІТЦ), хроматографічне очищення, фасування і ліофілізацію та перевірку на специфічність з обліком результатів дослідження під люмінесцентним мікроскопом, який **відрізняється** тим, що використовується з метою діагностики африканської чуми у свійських і диких свиней, одержання імуноглобулінів класу G здійснюється на рекомбінантний білок вірусу АЧС рK205R, а облік результатів досліджень проводиться під інвертованим світловим мікроскопом.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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