



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **89398** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/536 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 09587	(72) Винахідник(и): Ситюк Микола Петрович (UA), Байдалюк Вікторія Анатоліївна (UA), Білокінь Валерій Іванович (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.07.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2014, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НААН УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)

(54) ІМУНОПЕРОКСИДАЗНИЙ ТЕСТ ДЛЯ ВІРУСОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ

(57) Реферат:

Імунопероксидазний тест для вірусологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней включає висів клітин чутливої культури на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; розведення дослідного вірусомісного матеріалу методом десятикратних розведень в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном з подальшим його перенесенням в лунки мікропланшета з моношаром культури клітин; інкубацію протягом семи діб в умовах CO₂ інкубатора; видалення з лунок мікропланшета культурального середовища з відмиванням моношару клітин; внесення фіксуючого буфера в усі лунки мікропланшета; поетапне внесення в усі лунки мікропланшета - робочого розведення специфічної сироватки крові, робочого розведення кон'югату, розчину субстрату; зупинку реакції шляхом додавання стоп-розчину в кожну лунку планшета та облік реакції за допомогою інвертованого світлового мікроскопа, де інфіковані клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром. Спосіб застосовують для вірусологічної діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів цирковірусу другого типу. Для культивування використовують чутливі до цирковірусу другого типу культури клітин (SK-6, PK-15, ПСГК). Вирощений в культуральному посуді (скляні або пластикові матраци) моношар клітин знімають за допомогою розчину трипсин-версену у співвідношенні 1:9. Для культивування культур клітин у живильні середовища вносять 7-10 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби. Зараження чутливих культур клітин здійснюють при частковому формуванні їх моношару (50 %) з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби. Як контрольний вірус використовують референтні ("Stoon 1010") або депоновані штами цирковірусу другого типу. При фіксації моношару клітин використовують 96 % етиловий спирт. Як робоче розведення позитивної сироватки використовують специфічну сироватку крові свиней проти цирковірусу другого типу. При відмиванні моношару не використовують Твін-20. При зупинці реакції - NaCl; усі маніпуляції з підсушуванням моношару клітин проводять в умовах термостату при температурі 37 °C та експозиції - одна година.

UA 89398 U

Галузь техніки до якої належить корисна модель: ветеринарна вірусологія, зокрема, для діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів цирковірусу другого типу шляхом використання чутливих культур клітин.

Рівень техніки.

У світовій практиці при вірусологічній діагностиці цирковірусної інфекції свиней в лабораторних умовах застосовують такі методи: метод флуоресціюючих антитіл (FAVN), імунопероксидазний тест (NPLA), імуноферментний аналіз (ELISA) та полімеразну ланцюгову реакцію (PCR). Найбільш специфічним при контролі вірусної сировини, визначенню інфекційної активності цирковірусу другого типу є імунопероксидазний тест, котрий в Україні не розроблений. Аналог корисної моделі.

Методичні рекомендації по виявленню вірусу класичної чуми свиней та визначенню його інфекційної активності в культурі клітин імунопероксидазним методом / Ю.А. Собко, Л.Ю. Вергун, В.І. Білоконь, Ю.Д. Темніханов, В.А. Прискока. - Київ, 1998. - 13 с.

Для виявлення вірусу класичної чуми свиней (КЧС) та його інфекційної активності імунопероксидазним методом використовують первинно-трипсинізовану культуру клітин тестикул ягнят, що перевивались не більше п'яти разів або перещеплювані культури клітин SK-6 чи PK-15. Вирощений в культуральному посуді моношар клітин знімають розчином трипсин-версену (1:4), центрифугують при 200 g протягом 10-ти хвилин. Осад клітин ресуспендують у безсироватковому середовищі, доводять до 80 см³ живильним середовищем. Суспензію клітин вносять в 96-лункові мікротитраційні планшети з плоским дном по 0,2 см³ у лунку (Sarstedt, кат.№83.1835), культивують в CO₂-інкубаторі. Через 24 години, коли утворився повністю сформований моношар клітин, живильне середовище видаляють, у парні лунки планшет вносять по 0,2 см³ досліджуваного розведеного від 10⁻¹ до 10⁻⁶, референс-препарату - вірус КЧС штам «ЛК-М». При визначенні інфекційної активності культуральної рідини або вакцинного вірусу використовують десятикратне розведення вірусомісної суспензії (від 10⁻¹ до 10⁻⁶). У контрольні лунки з моношаром клітин вносять живильне середовище з 7-10% сироватки ягнят. Через 48-72 годин культуральне середовище вилучають, моношар клітин відмивають 1-2 рази 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) з рН 7,2-7,4. Потім у всі лунки планшета на 10 хвилин вносять по 0,15 см³ фіксуєного буфера (спирт-ацетонова суміш у співвідношенні 1:1). Після видалення фіксуєного буфера планшети виставляють на 2-3 години під настільну лампу до повного підсихання. Робоче розведення сироватки та кон'югату готують на 0,1 М ФБР рН 7,2-7,4 з 1% знежиреного молока. В контрольні та дослідні лунки вносять по 0,05 см³ гіперімунної свинячої сироватки, специфічної до вірусу КЧС в робочому розведенні. Інкубацію проводять під настільною лампою протягом 15-20 хвилин на відстані 15-20 см (лампа 60 Ват). Сироватку видаляють, лунки планшет відмивають три рази 0,1 М ФБР для відмивання рН 7,2-7,4 з 0,05% Твіном-20. Готують робоче розведення кон'югату (кролячий антисвинячий IgG, мічений пероксидазою хрому), вносять його по 0,05 см³ в лунки планшет та інкубують 20 хвилин під настільною лампою. Кон'югат видаляють із лунок планшет, відмивають три рази по 5 хвилин. Вносять по 0,05 см³ розчину субстрату (0,04% 3-аміно-9-етилкарбазол в Na-ацетатному буфері, рН 5,0) та ставлять на 15-20 хвилин під настільну лампу.

Реакцію зупиняють додаванням 0,1 см³ 0,15 М NaCl в кожну лунку. Видаляють і знову вносять 0,15 М NaCl. Мікроскопію проводять за допомогою інвертованого мікроскопа. Моношар клітин, вирощений в лунках, проглядають при малому збільшенні (×100) мікроскопа. Інфіковані клітини мають вигляд скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром. Результати титрування інфекційної активності вірусу виражають в тканинних клітинних інфекційних дозах (ТКІД₅₀), які визначають за методом Ріда і Менча або Кербера в модифікації І.П.Ашмаріна.

Імунопероксидазний метод виявлення вірусу класичної чуми свиней та визначення його інфекційної активності в культурі клітин використовують в Україні лише для індикації вірусу класичної чуми свиней. Для вірусологічної діагностики інших вірусних хвороб, в тому числі і цирковірусної інфекції свиней, даний метод не розроблений. Саме тому нашим завданням було розробити імунопероксидазний тест для діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів цирковірусу другого типу шляхом використання чутливих культур клітин, а також спростити деякі етапи постановки даного тесту, що прискорює його виконання у часі.

Даний аналог взято як найближчий прототип.

Суть корисної моделі. В основу корисної моделі поставлена задача розробити імунопероксидазний тест для діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів цирковірусу другого типу шляхом використання чутливих культур клітин. Поставлена задача вирішується тим, що імунопероксидазний тест складається з таких етапів: підготовки біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини від домашніх і диких свиней) на предмет виявлення цирковірусу другого типу або вакцинних, референтних штамів чи ізолятів цирковірусу другого типу для визначення титру інфекційної активності; висіву клітин чутливої культури (SK-6, PK-15, ПСГК) на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; титрування дослідного вірусомісного матеріалу та контрольного референтного штаму (Stoon 1010) з живильними середовищами методом десятикратних розведень в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном; перенесення вмісту лунок планшета з круглим дном у плоскодонний планшет з частково сформованим моношаром культури клітин із додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2 %) та інкубацію його протягом семи діб в умовах CO₂ інкубатора з концентрацією вуглекислоти 5 %; подальшого видалення культурального середовища й відмивання моношару клітин (1-2 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) pH 7,2-7,4; внесення фіксуючого буфера (96 % етиловий спирт) у всі лунки планшета на 10 хвилин з наступним його видаленням і підсушуванням протягом однієї години в умовах термостата; внесення робочого розведення специфічної до цирковірусу другого типу сироватки крові та після відмивання робочого розведення кон'югату (кролячий антисвинячий імуноглобулін G, мічений пероксидазою хрому) приготування на 0,1 М ФБР pH 7,2-7,4 з 1% знежиреного молока; внесення по 0,05 см³ розчину субстрату (0,04% 3-аміно-9-етилкарбазол в Na-ацетатному буфері, pH 5,0) з експозицією 15-20 хвилин в умовах термостата; зупинки реакції шляхом відмивання лунок планшета під проточною водою; мікроскопії за допомогою інвертованого мікроскопа, де інфіковані цирковірусом другого типу клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром.

Процес постановки імунопероксидазного тесту для виявлення ізолятів, штамів цирковірусу другого типу та визначення їх інфекційної активності полягає в наступному.

Компоненти необхідні для реакції.

Специфічну сироватку крові отримують шляхом багаторазової гіперімунізації здорових та попередньо досліджених свиней на предмет відсутності специфічних антитіл до цирковірусу другого типу. Перед імунізацією готують вірусну сировину, в якій попередньо очищують, концентрують та піддають інактивації цирковірус другого типу (референтні штами, депоновані штами, ізоляти). З метою одержання вищих титрів специфічних антитіл до вірусної сировини додають ад'ювант «Монтанід» марки 25. Перед кожною реімунізацією відбирають кров та досліджують сироватку на предмет наявності специфічних антитіл проти цирковірусу 2-го типу. Об'єм та дозу вірусної сировини, що вводиться тварині дослідники визначають у кожному конкретному випадку.

Негативна сироватка крові. Негативну (контрольну) сироватку крові одержують також від здорових неімунізованих свиней проти цирковірусної інфекції.

Цирковірус другого типу. Як робочий (контрольний) вірус використовують референтні ("Stoon 1010") або депоновані діагностичні штами вірусу, які антигенно споріднені з референтними штамами. Попередньо визначають інфекційну активність (титр). Зберігають віруси в ліофілізованому або у нативному (вірусотримуюча культуральна рідина) стані. Найкращі умови зберігання при температурі мінус 196 °C або мінус 80 °C. Періодично слід визначати інфекційну активність вірусу шляхом титрування в чутливій культурі клітин.

Культури клітин. У дослідженнях використовують чутливі культури клітин - SK-6, PK-15, ПСГК, які попередньо перевіряють на відсутність контамінації цирковірусом першого типу. З метою об'єктивної оцінки одержаних результатів досліди пов'язані з титруванням вірусів, визначенням їх інфекційної активності, антигенної спорідненості необхідно проводити в тій культурі клітин, у якій культивували вірус. У разі використання іншої культуральної моделі обов'язково проводять пасаж (пасажі) вірусу на обраній культурі з визначенням його інфекційної активності.

Постановку імунопероксидазного тесту проводять наступним чином. Моношар клітин чутливої культури (SK-6, PK-15, ПСГК), вирощений у культуральному посуді (скляні або пластикові матраци) знімають за допомогою розчину трипсин-версену (1:9), підраховують у камері Горяєва та висівають у концентрації з розрахунку 100000 клітин на 1 см² разом з ростовим середовищем з додаванням ембріональної сироватки великої рогатої худоби (7-10 %)

в об'ємі по 0,2 см в кожен лунку 96-лункового пластикового мікропланшета з плоским дном (планшети, що призначені для культур клітин) і культивують в CO₂-інкубаторі. Перед дослідженням підготовку біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини або вакцинні, референтні штами чи польові ізоляти цирковірусу другого типу) проводять таким чином: з органів готують 20 % суспензію матеріалу на фізіологічному розчині, а ліофільно висушений вірус розводять фізіологічним розчином до початкового об'єму. Дослідний матеріал (біологічний матеріал від свиней або вакцинні, референтні штами чи польові ізоляти цирковірусу другого типу) розводять живильним середовищем методом десятикратних розведень в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном (на кожний зразок матеріалу використовують по чотири лунки кожного розведення). Одночасно ставлять контролю.

1. Контроль культури клітин. У чотири лунки вносять тільки живильне середовище, для виявлення неспецифічної дегенерації клітин.

2. Контроль токсичності ростової сироватки. У чотири лунки вносять сироватку в найменшому розведенні, яку використовували в реакції.

3. Контроль робочого (контрольного) вірусу. Референтний або депонований штам цирковірусу другого типу вносять у чотири лунки та розводять десятикратними розведеннями від 10⁻¹ до 10⁻⁷.

Розведений матеріал планшета з круглим дном вносять до плоскодонного планшета з частково сформованим моношаром клітин (50 %) з додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2 %) та інкубують його протягом шести-семи діб в умовах CO₂ інкубатора з концентрацією вуглекислоти 5 %. Через шість-сім діб вміст планшета видаляють, а моношар клітин відмивають (1-3 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) pH 7,2-7,4. Після цього вносять фіксуючий буфер (96 % етиловий спирт) у всі лунки планшета на 15-20 хвилин з подальшим його видаленням та підсушуванням протягом однієї години в умовах термостату при температурі 37 °C. Готують робоче розведення специфічної до цирковірусу другого типу сироватки крові на 0,1 М ФБР pH 7,2-7,4 з 1% знежиреного молока та вносять по 0,05 см у кожен лунку планшета. Вміст лунок видаляють, а лунки відмивають (1-3 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) pH 7,2-7,4. Далі готують робоче розведення кон'югату (кролячий антисвинячий імуноглобулін G, мічений пероксидазою хрому) на 0,1 М ФБР pH 7,2-7,4 з 1% знежиреного молока з внесенням по 0,05 см³ у кожен лунку планшета. Знову вміст лунок видаляють, а лунки відмивають (1-3 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) pH 7,2-7,4 та додають розчин субстрату (0,04% 3-аміно-9-етилкарбазол в Na-ацетатному буфері, pH 5,0) з експозицією 15-20 хвилин в умовах термостату. Зупинку реакції здійснюють шляхом відмивання лунок планшета проточною водою. Облік результатів реакції проводять шляхом мікроскопії з використанням інвертованого світлового мікроскопа, де інфіковані цирковірусом другого типу клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Імунопероксидазний тест для вірусологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней, який включає висів клітин чутливої культури на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; розведення дослідного вірусовмісного матеріалу методом десятикратних розведень в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном з подальшим його перенесенням в лунки мікропланшета з моношаром культури клітин; інкубацію протягом семи діб в умовах CO₂ інкубатора; видалення з лунок мікропланшета культурального середовища з відмиванням моношару клітин; внесення фіксуючого буфера в усі лунки мікропланшета; поетапне внесення в усі лунки мікропланшета - робочого розведення специфічної сироватки крові, робочого розведення кон'югату, розчину субстрату; зупинку реакції шляхом додавання стоп-розчину в кожен лунку планшета та облік реакції за допомогою інвертованого світлового мікроскопа, де інфіковані клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром, який **відрізняється** тим, що застосовується виключно з метою вірусологічної діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів цирковірусу другого типу; для культивування використовують чутливі до цирковірусу другого типу культури клітин (SK-6, PK-15, ПСГК); вирощений в культуральному посуді (скляні або пластикові матраци) моношар клітин знімають за допомогою розчину трипсин-версену у співвідношенні 1:9; для культивування культур клітин у живильні середовища вносять 7-10 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби; зараження чутливих

- культури клітин здійснюють при частковому формуванні їх моношару (50 %) з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби; як контрольний вірус використовують референтні ("Stoon 1010") або депоновані штами цирковірусу другого типу; при фіксації моношару клітин використовують 96 % етиловий спирт; як робоче розведення позитивної сироватки використовують специфічну сироватку крові свиней проти цирковірусу другого типу; при відмиванні моношару не використовують Твін-20, а при зупинці реакції - NaCl; усі маніпуляції з підсушуванням моношару клітин проводять в умовах термостату при температурі 37 °С та експозиції - одна година.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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