



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89399

(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 09588	(72) Винахідник(и):	Ситюк Микола Петрович (UA), Артеменко Інна Василівна (UA), Білокінь Валерій Іванович (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA)
(22) Дата подання заявки:	31.07.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НААН УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.04.2014		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2014, Бюл.№ 8		

(54) ІМУНОПЕРОКСИДАЗНИЙ ТЕСТ ДЛЯ ВІРУСОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ РЕПРОДУКТИВНО-РЕСПІРАТОРНОГО СИНДРОМУ СВИНЕЙ

(57) Реферат:

Імунопероксидазний тест для вірусологічної діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому 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 буферу 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 репродуктивно-респіраторного синдрому у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. Для культивування використовують чутливі до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней культури клітин (CL 2621, MA-104, MARC-145). 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 на 48-72 години, коли повністю формується моношар клітин з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби. Як контрольний вірус використовують референтні ("Lelystad", "Hesse") або депоновані контрольні штами вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. При фіксації моношару клітин використовують 96 % етиловий спирт. Як робоче розведення позитивної сироватки використовують специфічну сироватку крові свиней проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому. 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 89399 U

Галузь техніки, до якої належить корисна модель: ветеринарна вірусологія, зокрема, для діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (вірусомісні: суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому шляхом використання чутливих культур клітин.

У світовій практиці при вірусологічній діагностиці репродуктивно-респіраторного синдрому свиней в лабораторних умовах застосовують такі методи: індикація вірусу у культурі клітин альвеолярних макрофагів свиней, метод флуоресціюючих антитіл (FAVN), імунопероксидазний тест (NPLA), імуноферментний аналіз (ELISA) та полімеразну ланцюгову реакцію (PCR). Найбільш доступним та специфічним при контролі вірусної сировини, визначенню інфекційної активності вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому є імунопероксидазний тест, котрий в Україні не розроблений.

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 10⁻⁸, референс-препарату вірус КЧС штам "ЛК-М". При визначенні інфекційної активності культуральної рідини або вакцинного вірусу використовують десятикратне розведення вірусмісної 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 буферу (спирт-ацетонова суміш у співвідношенні 1:1). Після видалення фіксуєного буферу 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 па 15-20 хвилин під настільну лампу. Реакцію зупиняють додаванням 0,1 см³ 0,15 М NaCl в кожен лунку. Видаляють і знову вносять 0,15 М NaCl. Мікроскопію проводять за допомогою інвертованого мікроскопу. 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 репродуктивно-респіраторного синдрому свиней, даний метод не розроблений. Саме тому нашим завданням було розробити імунопероксидазний тест для діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (вірусомісні: кров, суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому 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.

В основу корисної моделі поставлене задачу розробити імунопероксидазний тест для діагностики репродуктивно-респіраторного синдрому у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней шляхом використання чутливих культур клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що імунопероксидазний тест складається з таких етапів: підготовки біологічного матеріалу (суспензія органів, біологічні рідини від домашніх і диких свиней) на предмет виявлення вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней або його вакцинних, референтних штамів чи ізолятів для визначення титру інфекційної активності; висіву клітин чутливої культури (CL 2621, MA-104, MARC-145) на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; титрування дослідного вірусомісного матеріалу та контрольних референтних чи депонованих штамів з живильними середовищами методом десятикратних розведень в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном; перенесення вмісту лунок планшета з круглим дном у плоскодонний планшет із заздалегідь вирощеним (48-72 години) моношаром 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 буферу (96 % етиловий спирт) у всі лунки планшета на 10 хвилин з наступним його видаленням і підсушуванням протягом однієї години в умовах термостату; внесення робочого розведення специфічної до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней сироватки крові та після відмивання робочого розведення кон'югату (кролячий антисвинячий імуноглобулін G мічений пероксидазою хрому) приготуваних 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 термостату; зупинки реакції шляхом відмивання лунок планшета під проточною водою; мікроскопії за допомогою інвертованого мікроскопа, де інфіковані вірусом репродуктивно-респіраторного синдрому свиней 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 вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней 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 вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому. Перед імунізацією готують вірусну сировину, в якій попередньо очищують, концентрують та піддають інактивації вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней (референтні штами, депоновані штами, ізоляти). З метою одержання вищих тигрів специфічних антитіл проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней до вірусної сировини додають ад'ювант "Монтанід" марки 25. Перед кожною реімунізацією відбирають кров та досліджують сироватку на предмет наявності специфічних антитіл проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. 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 не імунізованих свиней проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней.

Вірус репродуктивно-респіраторного синдрому свиней. Як робочий (контрольного) вірус використовують референтні ("Lelystad", "Hesse") 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 - CL 2621, MA-104, MARC-145. 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 (CL 2621, MA-104, MARC-145), вирощений в культуральному посуді (скляні або пластикові матраци) знімають за допомогою розчину трипсин-версену (1:9), підраховують у камері Горяєва та висівають в концентрації з розрахунку 100000 клітин на 1 см² разом з ростовим середовищем на якому вирощували з додаванням ембріональної сироватки великої рогатої худоби (7-10 %) в об'ємі по 0,2 см³ в кожен лунку 96-лункового пластикового мікропланшета з плоским дном (планшети, що призначені для культур клітин) і культивують в СО₂-інкубаторі. Перед дослідженням підготовку біологічного матеріалу (суспензія органів, біологічні рідини або вакцинні, референтні штами чи польові ізоляти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней) проводять таким чином: з органів готують 20 % суспензію матеріалу на фізіологічному розчині, а ліофільно висушений вірус розводять фізіологічним розчином до початкового об'єму. Залежно від мети дослідження дослідний матеріал (біологічний матеріал від свиней або вакцинні, референтні штами чи польові ізоляти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней) 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 вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней вносять у чотири лунки та розводять десятикратними розведеннями від 10⁻¹ до 10⁻⁷.

Розведений матеріал планшета з круглим дном вносять до плоскодонного планшета із заздалегідь вирощеним (48-72 години) моношаром клітин з додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2 %) та інкубують його протягом шести-семи діб в умовах СО₂ 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) рН 7,2-7,4. Після цього вносять фіксує 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 °С. Готують робоче розведення специфічної до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней сироватки крові на 0,1 М ФБР рН 7,2-7,4 з 1 % знежиреного молока та вносять по 0,05 см³ у кожен лунку планшета. Вміст лунок видаляють, а лунки відмивають (1-3 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) рН 7,2-7,4. Далі готують робоче розведення кон'югату (кролячий антисвинячий імуноглобулін G мічений пероксидазою хрому) на 0,1 М ФБР рН 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) рН 7,2-7,4 та додають розчин субстрату (0,04 % 3-аміно-9-етилкарбазол в Na-ацетатному буфері, рН 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 репродуктивно-респіраторного синдрому 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 СО₂ інкубатора; видалення з лунок мікропланшета культурального середовища з відмиванням моношару клітин; внесення фіксує буферу 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 репродуктивно-респіраторного синдрому у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (суспензія органів, біологічні рідини) або визначення титру інфекційної активності вакцинних, референтних штамів чи польових ізолятів вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней; для культивування використовують чутливі до вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней культури клітин (CL 2621, MA-104, MARC-145); 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 на 48-72 годину, коли повністю формується моношар клітин з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби; як контрольний вірус використовують референтні ("Lelystad", "Hesse") або депоновані контрольні штами вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому свиней; при фіксації моношару клітин використовують 96 % етиловий спирт; як робоче розведення позитивної сироватки використовують специфічну сироватку крові свиней проти вірусу репродуктивно-респіраторного синдрому; 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 °C та експозиції - одна година.

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