



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 89920

(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 09586	(72) Винахідник(и):	Ситюк Микола Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки:	31.07.2013	(73) Власник(и):	ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НААН УКРАЇНИ,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	12.05.2014		вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	12.05.2014, Бюл.№ 9		

**(54) ІМУНОПЕРОКСИДАЗНИЙ ТЕСТ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЦИРКОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ СВИНЕЙ****(57) Реферат:**

Імунопероксидазний тест для серологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней включає висів клітин чутливої культури на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; розведення дослідних сироваток методом двократних розведень з додаванням робочого розведення цирковірусу другого типу в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном з подальшим їх контактом та перенесенням в лунки мікропланшета з моношаром культури клітин; інкубацію протягом семи діб в умовах CO<sub>2</sub> 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'югата, розчину субстрату; зупинку реакції шляхом додавання стоп-розчину в кожен лунку мікропланшета та облік реакції під інвертованим світловим мікроскопом, котрий базується на принципі наявності або відсутності специфічної зафарбованості клітин - інфіковані клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром. Тест застосовують для виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива); 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; дослідні сироватки крові перед дослідженням піддають інактивації при температурі 56 °C протягом 30 хвилин і титрують методом двократних розведень з додаванням робочого розведення 1000 ОІД цирковірусу другого типу (референтні - "Stoon 1010" або депоновані штами) та експозицією одну годину при +37 °C. Внесення вмістимого у лунки планшета з чутливою культурою клітин здійснюють при частковому формуванні їх моношару (50 %) з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби. Як контрольний вірус використовують референтні 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. Облік реакції враховують: наявність бляшок - відсутність антитіл, а відсутність бляшок - присутність антитіл проти цирковірусу другого типу в сироватках крові свиней.

UA 89920 U



Галузь техніки, до якої належить корисна модель: ветеринарна вірусологія, зокрема для виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу шляхом дослідження біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива) з використанням чутливих культур клітин.

5 Рівень техніки.

У світовій практиці при серологічній діагностиці цирковірусної інфекції свиней в лабораторних умовах застосовують імунопероксидазний тест в реакції нейтралізації (NPLA) та імуноферментний аналіз (ELISA). Найбільш специфічним є імунопероксидазний тест у реакції нейтралізації, котрий дозволяє визначати специфічні антитіла та їх рівень. В Україні не даний метод не розроблений. Аналог корисної моделі.

10 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. - К., 1998. - 13 с.

15 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 см<sup>3</sup> живильним середовищем. Суспензію клітин вносять в 96-лункові мікротитраційні планшети з плоским дном по 0,2 см<sup>3</sup> у лунку (Sarstedt, кат. № 83.1835), культивують в CO<sub>2</sub>-інкубаторі. Через 24 години, коли утворився повністю сформований моношар клітин, живильне середовище видаляють, у парні лунки планшет вносять по 0,2 см<sup>3</sup> досліджуваного розведеного від 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>, референс-препарату - вірус КЧС штам "ЛК-М". При визначенні інфекційної активності культуральної рідини або вакцинного вірусу використовують десятикратне розведення вірусмісної суспензії (від 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup>). 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 см<sup>3</sup> 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'югата готують на 0,1 М ФБР рН 7,2-7,4 з 1 % знежиреного молока. В контрольні та дослідні лунки вносять по 0,05 см<sup>3</sup> 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'югата (кролячий антисвинячий IgG, мічений пероксидазою хрому), вносять його по 0,05 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 см<sup>3</sup> 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 (ТКІД<sub>50</sub>), які визначають за методом Ріда і Менча або Кербера в модифікації І.П. Ашмаріна.

45 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 та серологічної діагностики інших вірусних хвороб, в тому числі і цирковірусної інфекції свиней, даний метод не розроблений. Саме тому нашою задачею було розробити імунопероксидазний тест у реакції нейтралізації для серологічної діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива) на предмет виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу з використанням чутливих культур клітин, а також спростити деякі етапи постановки даного тесту, що прискорює його виконання у часі.

55 Даний аналог взято як найближчий прототип.

Суть корисної моделі. В основу корисної моделі поставлена задача розробити імунопероксидазний тест у реакції нейтралізації для серологічної діагностики цирковірусної інфекції у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива) на предмет виявлення специфічних гуморальних антитіл проти

цирковірусу другого типу з використанням чутливих культур клітин. Поставлена задача вирішується тим, що імунопероксидазний тест складається з таких етапів: одержання біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива) від домашніх і диких свиней на предмет виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу; інактивація сироваток при температурі 56 °С з експозицією 30 хвилин; висіву клітин чутливої культури (SK-6, PK-15, ПСГК) на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; титрування дослідних та контрольних (позитивної та негативної) сироваток з живильними середовищами методом двократних розведень у 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном; внесенням у 96-лункові пластикові мікропланшети з круглим дном робочого розведення цирковірусу другого типу (референтні або депоновані штами) -1000 ОІД з експозицією при + 37 °С 1 година; перенесення вмісту лунок планшета з круглим дном у плоскодонний планшет з частково сформованим (50 %) моношаром культури клітин із додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2 %) та інкубацію його протягом семи діб в умовах CO<sub>2</sub> інкубатора з концентрацією вуглекислоти 5 %; подальшого видалення культурального середовища й відмивання моношару клітин (1-2 рази) 0,1 М фосфатно-буферним розчином (ФБР) рН 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 термостату; внесення робочого розведення специфічної до цирковірусу другого типу сироватки крові та після відмивання робочого розведення кон'югата (кролячий антисвинячий імуноглобулін G, мічений пероксидазою хрому) приготуваних на 0,1 М ФБР рН 1,2-1,А з 1 % знежиреного молока; внесення по 0,05 см<sup>3</sup> розчину субстрату (0,04 % 3-аміно-9-етилкарбазол в Na-ацетатному буфері, рН 5,0) з експозицією 15-20 хвилин в умовах термостату; зупинки реакції шляхом відмивання лунок планшета під проточною водою; облік результатів реакції шляхом мікроскопії лунок планшета 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 і оцінюється, як відсутність антитіл в сироватці, а відсутність бляшок оцінюється, як присутність антитіл в сироватці (титр).

Процес постановки імунопероксидазного тесту для виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу в сироватках крові, молоці, молозиві 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. 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 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 °С або мінус 80 °С. 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 вибраній культурі з визначенням його інфекційної активності.

Постановку імунопероксидазного тесту проводять наступним чином. Моношар клітин чутливої культури (SK-6, PK-15, ПСГК), вирощений в 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 см<sup>2</sup> разом з ростовим середовищем, на якому вирощували з додаванням ембріональної сироватки великої

рогатої худоби (7-10 %), в об'ємі по 0,2 см<sup>3</sup> в кожен лунку 96-лункового пластикового мікропланшета з плоским дном (планшети, що призначені для культур клітин) і культивують в СО<sub>2</sub>-інкубаторі. Перед дослідженням підготовку біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива або вакцинних, референтних штамів цирковірусу другого типу) проводять

5 таким чином: кров, молоко, молозиво відбирають від домашніх та диких свиней та одержують сироватку, яку піддають інактивації при температурі 56 °С та експозиції 30 хвилин; ліофільно висушений вірус (референтні або депоновані штами цирковірусу другого типу) з визначеною інфекційною активністю розводять фізіологічним розчином до початкового об'єму, а вірусотримуючу суспензію (референтних або депонованих штамів цирковірусу другого типу), що

10 зберігалася в замороженому стані розморожують. У 96-лунковий пластиковий мікропланшет з круглим дном вносять живильне середовище з розрахунку 100 мкл на кожен лунку. Дослідні сироватки (крові, молока, молозива) та позитивну сироватку крові вносять у перший ряд в об'ємі 100 мкл ресуспендують вмістиме та переносять в об'ємі 100 мкл за допомогою восьмиканальної автопіпетки в лунки наступного ряду, використовуючи метод двократних розведень. На кожний

15 зразок матеріалу використовують по чотири лунки кожного розведення. Одночасно ставлять контроль.

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

20 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<sup>-1</sup> до 10<sup>-7</sup>.

4. Позитивний контроль сироватки. У чотири лунки вносять специфічну до цирковірусу

25 другого типу сироватку крові свині та розтитровують методом двократних розведень.

До кожної лунки планшета з розтитрованими дослідними та позитивною сироватками вносять робоче розведення 1000 ОІД цирковірусу другого типу (референтні або депоновані штами) в об'ємі 100 мкл і витримують одну годину при +37 °С. Після експозиції вмістиме планшета з круглим дном вносять до плоскодонного планшета з частково сформованим

30 моношаром клітин (50 %) з додаванням ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби (2 %) та інкубують його протягом шести - семи діб в умовах СО<sub>2</sub> 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 фіксуючий буфер (96 % етиловий спирт) у всі лунки планшета на 15-20 хвилин з

35 подальшим його видаленням та підсушуванням протягом однієї години в умовах термостату при температурі 37 °С. Готують робоче розведення специфічної до цирковірусу другого типу сироватки крові на 0,1 М ФБР рН 7,2-7,4 з 1 % знежиреного молока та вносять по 0,05 см у кожну лунку планшета. Вміст лунок видаляють, а лунки відмивають (1-3 рази) 0,1 М фосфатно-

40 буферним розчином (ФБР) рН 7,2-7,4. Далі готують робоче розведення кон'югата (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 см<sup>3</sup> у кожну 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

45 відмивання лунок планшета проточною водою. Облік результатів реакції здійснюють шляхом проглядання лунок планшета під інвертованим мікроскопом та базується на принципі наявності або відсутності специфічної зафарбованості клітин. Уражені цирковірусом другого типу клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром). Критерії оцінки реакції: контроль культури клітин -

50 моношар клітин без наявності ознак дегенерації та бляшок; контроль робочого (контрольного) вірусу - наявність бляшок, котрі зменшуються у розмірі та кількості з кожним розведенням вірусу (останнє розведення вірусу, при якому присутні бляшки, враховується при визначенні титру вірусу); позитивний контроль сироватки - відсутність бляшок в початкових розведеннях сироватки за рахунок нейтралізації робочого вірусу специфічними антитілами сироватки

55 (останнє розведення сироватки, при якому відсутні бляшки, враховується при визначенні титру сироватки); дослідні позитивні до цирковірусу другого типу сироватки крові, молока, молозива - відсутність бляшок в початкових розведеннях сироватки за рахунок нейтралізації робочого вірусу специфічними антитілами сироватки (останнє розведення сироватки, при якому відсутні бляшки, враховується при визначенні титру сироватки); дослідні негативні до цирковірусу другого

60 типу сироватки крові, молока, молозива - присутність бляшок у всіх розведеннях сироватки за

рахунок відсутності специфічних антитіл та розмноження робочого (контрольного) вірусу в клітинах.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Імунопероксидазний тест для серологічної діагностики цирковірусної інфекції свиней, який включає висів клітин чутливої культури на 96-лункові пластикові мікропланшети з плоским дном; розведення дослідних сироваток методом двократних розведень з додаванням робочого розведення цирковірусу другого типу в 96-лункових пластикових мікропланшетах з круглим дном з подальшим їх контактом та перенесенням в лунки мікропланшета з моношаром культури клітин; інкубацію протягом семи діб в умовах CO<sub>2</sub> 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'югата, розчину субстрату; зупинку реакції шляхом додавання стоп-розчину в кожну лунку мікропланшета та облік реакції під інвертованим світловим мікроскопом, котрий базується на принципі наявності або відсутності специфічної зафарбованості клітин - інфіковані клітини мають вигляд поодиноких клітин або скупчень клітин (бляшок) із забарвленою в темно-червоний колір цитоплазмою та світлим ядром, який **відрізняється** тим, що тест застосовують для виявлення специфічних гуморальних антитіл проти цирковірусу другого типу у домашніх та диких свиней шляхом дослідження біологічного матеріалу (сироваток крові, молока, молозива); 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; дослідні сироватки крові перед дослідженням піддають інактивації при температурі 56 °C протягом 30 хвилин і титрують методом двократних розведень з додаванням робочого розведення 1000 ОІД цирковірусу другого типу (референтні - "Stoon 1010" або депоновані штами) та експозицією одну годину при +37 °C; внесення вмістимого у лунки планшета з чутливою культурою клітин здійснюють при частковому формуванні їх моношару (50 %) з додаванням 2 % ембріональної сироватки крові великої рогатої худоби; як контрольний вірус використовують референтні 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 °C та експозиції - одна година; облік реакції враховують: наявність бляшок - відсутність антитіл, а відсутність бляшок - присутність антитіл проти цирковірусу другого типу в сироватках крові свиней.

10

15

20

25

30

35

---

Комп'ютерна верстка О. Рябко

---

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