

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, зокрема до способів постановки реакції нейтралізації, і може бути використана в роботі діагностичних та науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини.

Реакцію нейтралізації (РН) ґрунтують на властивості імунної сироватки, що додають до відповідного вірусу, блокувати його здатність до репродукції в чутливій біологічній системі. Здатність імунної сироватки інактивувати інфекційну активність вірусу є наслідком взаємодії нейтралізуючих антитіл з певними антигенними детермінантами поверхневих вірусних білків, що відповідають за адсорбцію вірусу на клітині-хазяїні. РН застосовують як для ідентифікації виділених вірусів, так і для серологічної діагностики вірусних інфекцій.

У загальноприйнятій технологічній процес постановки РН у культурі клітин для серологічної діагностики вірусних інфекцій входить приготування розведень парних сироваток крові з 2- або 4-разовим інтервалом (як правило від 1:10 до 1:640 або 1:1280). Об'єм кожного розведення сироватки має бути не меншим за 0,4 см³ (з розрахунку створення надалі нейтралізаційних сумішей 0,4 см³ антигену та 0,4 см³ сироватки і внесення по 0,2 см³ суміші в 4 пробірки). До різних розведень сироваток крові додають суспензії вірусу в дозі 100 ТЦД₅₀ у 0,1 см³, інкубують отримані суміші при температурі 37 °С впродовж 1-2 годин, вносять кожен суміш в 4 пробірки з 24-48-годинною моношаровою культурою клітин з попереднім видаленням з них сироватки росту. Культуру клітин інкубують при температурі 37 °С впродовж 7 днів.

Облік результатів РН проводять щодня впродовж 7 діб шляхом перегляду під малим збільшенням мікроскопа. Реакцію вважають позитивною за відсутності цитопатичної дії (ЦПД) вірусу в пробірках з досліджуваною сироваткою, зважаючи на наявність ЦПД у контрольних зразках вірусу, відсутність ЦПД в культурі, що інокульована сумішшю вірусу зі специфічною імунною сироваткою, і відсутності слідів дегенерації в контролях культури клітин (див. 1. Ветеринарно-санітарна вірусологія / В.Г. Скибіцький, О.С. Калініна, Г.В. Козловська. – Київ: Олді плюс, 2020. - 416 с. Посібник з медичної вірусології / за ред. В.М. Гіріна. – Київ: Здоров'я, 1995. – 367 с. 2. Вірусологія / С.П. Гудзь, Г.Б. Перетятко, А.А. Галушка. – Львів, вид-тво ЛНУ, 2018. – 536 с.).

Недоліки аналога.

Застосування моношарової культури клітин потребує 2-3 дні для її формування, що збільшує час проведення досліджень та ускладнює масові експресні діагностичні дослідження.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, який дозволяє скоротити час, зменшити трудомісткість та підвищити чутливість реакції нейтралізації.

Поставлена задача вирішується в способі виявлення вірусів у біологічному матеріалі тварин. Реакцію нейтралізації проводять із застосуванням суспензії клітин замість моношару клітин. При цьому вірус зв'язують зі специфічними антитілами позитивної до вірусу сироватки, що проявляється відсутністю цитопатичної дії в культурі клітин.

Приклад здійснення способу.

Для проведення реакції беруть робоче розведення вірусу 100 ТЦД₅₀/0,1 см³. Сироватки крові тварин у розведенні 1:10 прогривають у водяній бані при 56 °С протягом 30 хвилин. Готують серію розведень сироваток (від 1:10 до 1:1280), додають суспензію вірусу, інкубують суміші при 37 °С протягом 1-2 годин, після чого вносять у пробірки із суспензією клітин. Інкубацію проводять протягом 7 днів. Результати обліковують щодня під малим збільшенням мікроскопа. Відсутність ЦПД у дослідних пробах свідчить про наявність антитіл у сироватках крові.

Одночасно ставлять контроль:

Контроль культури клітин: у 4 пробірки вносять суспензію клітин, через 2-3 дні має бути сформований моношар клітин.

Контроль токсичності сироватки: у 4 пробірки вносять сироватку в найменшому розведенні, яке використовували в реакції.

Контроль специфічності вірусу:

- робоче розведення вірусу змішують з дворазовими розведеннями специфічної сироватки, інактивованої при 56 °С в розведенні 1:10;

- робоче розведення вірусу змішують з дворазовими розведеннями нормальної сироватки, інактивованої при 56 °С в розведенні 1:10.

Контроль робочого розведення вірусу: по 4 пробірки з суспензією клітин заражають вірусом робочого розведення, а також трьох зменшених розведень.

У контрольній культурі клітин має бути сформований моношар без слідів дегенерації. У контролі дози вірусу моношар має бути відсутній. Сформований моношар свідчить про наявність антитіл у сироватках крові.

Переваги.

Використання суспензії клітин замість моношару дозволяє: скоротити час проведення реакції; зменшити трудомісткість; підвищити чутливість та специфічність методу.

Експериментальні випробування запропонованого для корисної моделі методу були проведені в лабораторії Дослідної станції епізоотології Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Вони підтвердили ефективність запропонованого нового способу.