



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118343

(13) U

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 12220**

(22) Дата подання заявки: **01.12.2016**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **10.08.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **10.08.2017, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

**Новікова Оксана Юріївна (UA),  
Варяниця Вікторія Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ПУБЛІЧНЕ АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО  
"ФАРМСТАНДАРТ-БІОЛІК",  
Помірки, м. Харків, 61070 (UA)**

(74) Представник:

**Шевеля Микола Васильович, реєстр.  
№20**

## (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АНТИРАБІЧНОГО АНТИГЕНУ IN VITRO В ІНАКТИВОВАНИХ АНТИРАБІЧНИХ ВАКЦИНАХ

### (57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену in vitro в інактивованих антирабічних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабічними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабічних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками. Кількісне визначення вмісту антирабічного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещеплюваної культури клітин ВНК-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабічними антитілами до суміші як еталонного вірусу сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливу до вірусу сказу культури клітин додають перещеплювану культуру клітин.

UA 118343 U



Корисна модель належить до медичної та ветеринарної вірусології, зокрема до лабораторних тестів з кількісного визначення антирабічного антигену у сировині при виробництві інактивованих антирабічних вакцин чи при контролі готових вакцин.

Сказ до сьогодні залишається значною медичною та соціальною проблемою у всьому світі. Це обумовлено тим, що зберігається постійна загроза зараження людей вірусом сказу, що належить до роду *Lyssavirus* родини *Rhabdoviridae*, у зв'язку з наявністю природних осередків розповсюдження цієї контагіозної нейротропної інфекції серед диких та свійських тварин. За даними ВООЗ, у світі кожен рік реєструється в середньому 50 тисяч випадків активно-пасивної обробки людей, що постраждали від укусів тварин, і 35-50 тис. випадків смерті від сказу [1]. Кількісне визначення вмісту антигену у вакцині є важливим етапом її розробки і виробництва. При цьому вдосконалення методів контролю антирабічних вакцин залишається актуальною задачею. Специфічна активність вакцини є вирішальним показником при її розробці та виробництві. Даний метод може використовуватися при дослідженні несорбованих та сорбованих інактивованих антирабічних вакцин та антигену для імунізації тварин - продуцентів антирабічної крові.

Антирабічний антиген - це інактивований вірус сказу фіксованого штаму, що може бути сировиною для отримання антирабічних вакцин;

Антирабічна вакцина - це антирабічний антиген, очищений шляхом фільтрації та/або сорбції на адюванті та призначений для стимуляції вироблення антирабічних антитіл при введенні в організм людини та тварин (наприклад, антирабічні вакцини для людини Verorab, Indirab, КОКАВ);

Чутлива до вірусу сказу культура клітин - культура клітин, що має на поверхні мембрани рецептори, для зв'язування з поверхневими білками вірусу; чутливі культури здатні уражатись відповідним вірусом, використовуються для його культивування (наприклад, чутливі до вірусу сказу культури БНк-21, Vero, Neuro-2a тощо);

Поживне середовище - рідке середовище, що має стандартизований вміст розчинених поживних речовин (амінокислот, солей, додаткових факторів), що необхідні для росту клітин, використовується для культивування клітин *in vitro* (наприклад MEM, DMEM, GMEM);

Первинна культура клітин - культура клітин, отримана шляхом дезагрегації тканини, що має обмежену кількість поділів, культура клітин є первинною до першого пасажу (наприклад, первинна культура ембріонів курей, первинна культура нирок сирійського хом'ячка);

Перещеплювала культура клітин - культура клітин, отримані шляхом трансформації з первинної культури клітин, мають необмежену кількість поділів при культивуванні *in vitro* (наприклад, культури БНк-21, Vero, Neuro-2a, SPEV тощо);

Досліджувана вакцина - вакцина, активність якої встановлюється в ході поточного досліджу;

Стандартна антирабічна вакцина - 2 міжнародний стандарт антирабічної вакцини, отриманий в інституті NIBSK;

Нуклеопротеїн вірусу сказу - комплекс геномної РНК вірусу, зв'язаний з N-протеїном, являє собою компактизований геном вірусу;

FITC-мічені антитіла - антитіла до поверхневого глікопротеїну вірусу сказу; при зв'язуванні з цим білком, утворює комплекси антиген-антитіло, що випромінює специфічне зелене світіння при опроміненні ультрафіолетом.

Найбільш розповсюдженим способом визначення активності вакцин є тест визначення імуногенності на мишах - NIH-тест на мишах Wibur L. A., Aubert F. A. The NIH test for potency test // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4<sup>th</sup>-p. 360-368 [2]. Однак, наведений метод потребує значних витрат часу (час виконання 60 діб), а також пов'язаний з використанням дороговартісних лінійних лабораторних мишей. Процес виробництва антирабічних препаратів потребує застосування більш швидких проміжних методів визначення антирабічного антигену.

Більшість способів визначення антитіл чи антигенів збудників базується на їхній здатності до нейтралізації *in vitro* з утворенням комплексів антиген-антитіло. Було запропоновано спосіб визначення антигену шляхом постадійного зв'язування глікопротеїну вірусу сказу в досліджуваних зразках з первинними, а потім-вторинними антитілами, що містять флуоресцентну мітку (Smitt, Todd, Ruprech, Charles Assay for analyses of rabies virus glycoprotein. WO2014059434-17.04.14) [3]. Реєструється безпосередньо сигнал вторинних антитіл, що утворили комплекси. Результати вимірювань дослідних зразків порівнюються з контролем міжнародного стандартного зразка антигену, що дозволяє виражати результат в МО. Спосіб є досить експресним та точним, проте потребує застосування специфічних первинних та вторинних антитіл, що здорожує контроль. В той час, як запропонований нами метод не

потребує додаткових реактивів та матеріалів, окрім тих, що використовуються при виробництві інактивованих вакцин.

Відомий спосіб кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в культуральних інактивованих антирабічних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабічними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабічних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротейну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками (Barth, R. The Modified antibody-binding test for the *in vitro* quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccines [text]// Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4<sup>th</sup>-p. 394-397.) Даний спосіб вибрано як прототип. Цей спосіб має назву модифікований тест зв'язування антитіл (modified antibody-binding test-MABT) [4]. Принцип методу полягає в двохетапній нейтралізації досліджуваних вакцин зі стандартом імуноглобуліну, а потім - надлишку реакції з живим вірусом сказу штаму Flury HEP 34. Спосіб складається з трьох принципових етапів:

1. Приготування серійних двократних розведень досліджуваних та стандартної антирабічних вакцин;

2. Приготування розчину стандарту антирабічного імуноглобуліну та додавання його до вакцин для проведення реакції нейтралізації антиген-антитіло;

3. Приготування робочого розведення вірусу штаму Flury HEP 34 та його додавання до реакційної суміші для виявлення незв'язаних антитіл.

У цьому методі як чутливий об'єкт використовується первинна культура клітин ембріонів курей. Здійснюється висів культури клітин в 96-лунковий планшети, після чого вони інкубуються в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при стандартній температурі культивування 37 °C протягом 24±2 годин (при досягненні конфлюентності моношаром). На другий день тесту в пробірках готуються дворазові (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваної і стандартної вакцин (відкаліброваної відповідно до 2 Міжнародного Стандарту антирабічної вакцини). Суміш інкубується в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при 37 °C протягом години. Далі до суміші вакцин та імуноглобуліну додається еквівалентна кількість біомаси вірусу штаму Flury HEP 34 з активністю 5000 TCID<sub>50</sub>/мл. Через годину інкубування суміш вакцин, антирабічних антитіл та вірусу (далі - реакційна суміш) вноситься до 24-годинного моношару клітин первинної культури клітин ембріонів курей. Далі клітини культивуються протягом 72 годин, після чого моношар фіксується, забарвлюється за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротейну вірусу сказу, а далі візуалізується за допомогою люмінесцентного мікроскопа. Облік проводиться за позитивними лунками. Позитивною вважається лунка, в якій розмноження вірусу пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл. В лунках, де така інгібіція вірусу не відбулась, реєструється один чи більше флуоресцентних фокусів вірусу.

Описаний метод має ряд недоліків:

1. Одержання первинної культури клітин з курячих ембріонів відбувається шляхом їх ферментативної дезінтеграції. Ця процедура є тривалою та трудомісткою, отримані культури тканин є не стандартизованими. Кількість їх поділів *in vitro* обмежена, що викликає труднощі зі збереженням показників стабільності об'єкта.

2. Не виключена можливість контамінації культур латентними вірусами та мікоплазмами. З цих причин, на сьогодні у всьому світі для проведення досліджень *in vitro* використовуються стандартизовані та паспортизовані культури клітин з сертифікованих колекцій та банків.

3. Тривалість тесту до отримання результатів становить 4 доби, клітини виконаного моношару складніше і повільніше уражаються вірусом, це збільшує час тесту.

4. Штам вірусу Flury HEP 34 на сьогодні не використовується в світі як стандартний штам.

В основу корисної моделі поставлена задача більш швидкого та точного визначення антигену в антирабічних вакцинах при стандартизованих умовах.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованих антирабічних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабічними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабічних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротейну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за

зараженими лунками, згідно з корисною моделлю, кількісне визначення вмісту антирабічного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещеплюваної культури клітин ВНк-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабічними антитілами до суміші як еталонний вірус сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливий до вірусу сказу культури клітин додають перещеплювану культуру клітин.

Перещеплювану культуру клітин вибирають з групи L929, 3T3 і ВНк-21.

Як чутливі до вірусу сказу культури клітин вибирають перещеплювану культуру клітин ВНк-21.

Відповідно до корисної моделі здійснюють попереднє приготування реакційної суміші з подальшим внесенням суспензії клітин.

Принцип методу полягає в інкубуванні досліджуваного та стандартного антигену з антирабічними антитілами протягом 60 хвилин в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при температурі близько 37 °С, після чого додається суспензія вірусу сказу штаму CVS (Challenge Virus Standard) і суміш інкубується ще близько 60 хвилин в аналогічних умовах. Після цього в суміш вноситься суспензія культури клітин ВНк-21 (культура клітин нирки сирійського хом'яка), клітини з інокульованою в них сумішшю культивуються протягом 2 діб. Потім моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном та фарбується за допомогою FITC-мічених антитіл до антигену вірусу сказу та аналізуються за допомогою імуофлуорисцентного методу.

Таким чином, оптимізація нами способу кількісного визначення антирабічного антигену *in vitro* в інактивованій культуральній антирабічній вакцині полягає в наступному: 1) використання для тесту чутливої до вірусу сказу перещеплюваної культури клітин ВНк-21 замість первинної; 2) застосування еталонного штаму вірусу сказу (штам CVS); 3) попереднє приготування реакційної суміші з безпосереднім внесенням до неї суспензії клітин, що скорочує час дослідження та робить інфікування клітин більш ефективним та доступним для спостереження.

Методика виконується таким чином: до всіх лунок 96-лункового планшета за допомогою багатоканального дозатора вноситься поживне середовище (Ігла MEM або DMEM) (див. таблицю). До лунок 1-4 ряду А вноситься стандартна антирабічна вакцини, в лунки 5-9 та 9-12 рядів А та Е вносяться досліджувані вакцини. Шляхом піпетування готуються двократні (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваних і стандартної вакцин, середовище, що залишилось в процесі фільтрації, видаляється з останньої лунки. В лунки Е1-Н4 96-лункового планшета вакцини не додаються, ці лунки залишаються для постановки позитивного та негативного контролів вірусу.

Готується робоче розведення стандарту антирабічного імуноглобуліну (відкаліброваного за Шостим Міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну) зі специфічною активністю 0,6-0,7 МО/мл (кінцева активність становить 0,3-0,35 МО/мл). Розчин імуноглобуліну інокулюється до всіх лунок, окрім лунок Е1-Н2. Дана суміш (вакцина та імуноглобулін) інкубується протягом 1 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при температурі близько 37 °С.

Після цього в усі лунки планшета (окрім Е1-Н2) додається вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID<sub>50</sub>/мл. Паралельно у лунках Е1-Н3 готується 4 послідовних п'ятикратних розведення (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) вірусу CVS для контролю з метою уточнення наявності необхідної інфекційної активності. Лунки Е3-Н3 залишаються вільними для контролю ростових якостей культури клітин ВНк-21, що використовується для дослідів.

Після цього до суміші вноситься суспензія культури клітин ВНк-21 в концентрації 2 млн клітин/мл. Планшети залишаються для інкубування в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при температурі близько 37 °С з 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфері.

Таблиця

Схема 96-лункового планшета та розведення розчинів в ньому

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	стандарт 1: 2	стандарт	стандарт	стандарт	№1 1: 2	№1	№1	№1	№3 1: 2	№3	№3	№3
B	1: 4				1: 4				1: 4			
C	1: 8				1: 8				1: 8			
D	1:16				1:16				1:16			
E	CVS 1: 5	CVS	K- ВНК-21	K	№2 1: 2	№2	№2	№2	№4 1: 2	№4	№4	№4
F	1: 25				1: 4				1: 4			
G	1: 125				1: 8				1: 8			
H	1: 625				1:16				1:16			

Далі до реакційної суміші в усі лунки планшета вноситься суспензія 2-добової культури клітин ВНК-21 в концентрації 2,5 млн клітин/мл. Через термін в межах 48 годин культивування, моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном протягом близько 30 хвилин. Після фіксації моношар фарбується за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу та візуалізується за допомогою флюоресцентного мікроскопа (об'єктив Х10, окуляр Х20). Облік здійснюється за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл якого в кожній лунці переглядають послідовні поля зору, і як позитивні відзначають поля, що містять хоча б один фокус, що флуоресцює.

Математична обробка результатів тесту проводиться методом Spearman-Kärber за формулою:

$\lg ED_{50} = (x_0 - d/2 + d \sum r_i / n_i)$ , де:

$x_0$  -  $\lg$  найбільшого розведення досліджуваного антигену, всі лунки якого позитивні;

$d$  -  $\lg$  фактора розведення антигена;

$n_i$  - загальна кількість лунок, що припадають на кожне розведення антигену;

$r_i$  - кількість позитивних лунок в кожному розведенні антигену;

Перерахунок в МО/мл здійснюється за формулою:

Кількість МО/мл в досліджуваному антигені =  $10^{\lg ED_{50}}$  (досліджуваного антигена) /  $10^{\lg ED_{50}}$  (стандарту вакцини) × кількість МО/мл в стандарті вакцини (1 МО/мл)

Приклад 1

До всіх лунок 96-лункового планшета за допомогою багатоканального дозатора вноситься по 50 мкл поживного середовища (Ігла MEM або DMEM). До лунок 1-4 ряду А вноситься по 50 мкл стандартної антирабічної вакцини, в лунки 5-9 та 9-12 рядів А та Е вноситься по 50 мкл досліджуваних вакцин (по 4 лунки на 1 зразок вакцини). Шляхом піпетування готуються двократні (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) розведення досліджуваних і стандартної вакцин, 50 мкл середовища з останньої лунки видаляється.

Готується робоче розведення стандарту антирабічного імуноглобуліну (відкаліброваного за Шостим Міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну) зі специфічною активністю 0,6 МО/мл (кінцева активність становить 0,3 МО/мл). Розчин імуноглобуліну інокулюється до всіх лунок, окрім лунок Е1-Н2. Дана суміш (вакцина та імуноглобулін) інкубується протягом 1 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37 °С.

Суспензія вірусу CVS з активністю  $5 \cdot 10^{-6}$ , що зберігається в замороженому стані при -70 °С розморожується на водяній бані з температурою +10-15 °С. Після чого розводиться охолодженим середовищем DMEM 1:1000 (до активності 5000 CCID<sub>50</sub>). Після цього в усі лунки планшета, окрім від Е1 до Н2 включно, додають вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID<sub>50</sub>. Паралельно у лунках Е1-Н2 готується 4 послідовних п'ятикратних розведення (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) вірусу CVS для контролю активності вірусу.

Планшети залишаються для інкубування в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при 37 °С з 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфері.

Моношар культури клітин ВНК-21, що культивувалась протягом двох діб з моменту попереднього пасажування, диспергується за допомогою 0,05 % розчину трипсину у розчині Версена. Здійснюється підрахунок концентрації клітин в камері Горяєва. Здійснюється

розрахунок, і суспензія в культуральному флаконі розводиться поживним середовищем до концентрації  $5 \times 10^5$  клітин в мілілітрі. Далі до реакційної суміші в планшеті, до всіх лунок додається по 100 мкл приготованої клітинної суспензії.

Через період часу близько 48 годин культивування, моношар клітин фіксується 85 % охолодженим ацетоном протягом близько 30 хвилин. Після фіксації моношар фарбується за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу та візуалізується за допомогою флюоресцентного мікроскопа (об'єктив Х10, окуляр Х20).

Облік проводиться за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл. Наприклад, в зразку досліджуваної вакцини були отримані наступні результати: в розведенні. Приклад підрахунку кількості антирабічного антигену.

Активність вакцини:

$$\lg ED_{50} = x_0 - d/2 + d \sum r_i / n_i = 0,60 - 0,3/2 + 0,3 (4/4 + 2/4) = 0,60 - 0,15 + 0,45 = 0,90.$$

Активність вакцини в МО/мл:

$$0,90 / 0,45 \times 1 = 2 \text{ МО/мл.}$$

Таким чином, наведений спосіб має наступні переваги в порівнянні з прототипом:

1. Використанням для тесту чутливої до вірусу сказу перещеплюваної культури клітин ВНК-21 замість первинної, що дозволяє стандартизувати культуру для виконання методу та уникнути необхідності проводити додаткові контролю об'єкта в ході самого тесту.

2. Зміна послідовності проведення реакції нейтралізації та вирощування моношару клітин, а саме - додавання до реакційної суміші суспензії клітин, дозволяє вирішити одразу дві задачі: скорочує час проведення тесту, а також збільшується площа поверхні, що контактує з вірусом, і може більш ефективно інфікуватись. В прототипі спочатку відбувається отримання та культивування первинної культури клітин протягом 24 годин, після чого проводиться реакція поетапної нейтралізації антиген-антитіло-вірус, яка вноситься до моношару, і культивується протягом 72 годин. Таким чином, весь час тесту становить 96 годин (4 доби), тоді як наведений спосіб дозволяє отримувати аналогічні результати протягом 48 годин.

3. Застосування еталонного штаму вірусу сказу (штам CVS), що відповідає сучасним вимогам та дозволяє порівнювати результати тесту з результатами інших лабораторій, де використовують стандартний штаб.

4. Всі операції виконуються на одному 96-лунковому культуральному планшеті, що дає змогу компактно розмістити необхідні контролю (контроль антирабічної вакцини, контроль антирабічного імуноглобуліну, вірусу та культури клітин) та досліджувані зразки - в кількості 4 зразки в одній реакції, в 4 аналогічних повторях кожен.

Джерела інформації:

1. Пухова, Н.М. Универсальная антирабическая вакцина для животных и критерии ее эффективности [текст] // Самуйленко А.Я., Еремеев И.В. и др. Известия Самарского научного центра РАН. - 2011. - т. 13, № 5(3). - с. 175-177.

2. Aubert M.F. A. Methods of the calculation of titres. Appendix 3 [text] // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4<sup>th</sup>. p. 445-447.

3. Smitt, Todd, Ruprech, Charles Assay for analyses of rabies virus glycoprotein WO2014059434-17.04.14.

4. Barth, R. The Modified antibody-binding test for the in vitro quantification of rabies virus antigen in inactivated rabies vaccines [text] // Laboratory Techniques in Rabies. World Health Organization. - Switzerland, Geneva. - 1996. - 4<sup>th</sup>. - p. 394-397.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб кількісного визначення антирабічного антигену in vitro в інактивованих антирабічних вакцинах, який полягає у зв'язуванні досліджуваного та стандартного антигену в двократних розведеннях з антирабічними антитілами та еталонним вірусом сказу в багатолунковому планшеті з використанням для тесту чутливої до вірусу сказу культури клітин, яку додають в усі лунки планшета і здійснюють інкубування суміші вакцин, антирабічних антитіл, вірусу сказу та чутливої до вірусу сказу культури клітин, після чого її культивують, а потім моношар клітин фарбують за допомогою FITC-мічених антитіл до нуклеопротеїну вірусу сказу, візуалізують та здійснюють облік за зараженими лунками, який **відрізняється** тим, що кількісне визначення вмісту антирабічного антигену здійснюється шляхом реакції нейтралізації антиген-антитіло з використанням перещеплюваної культури клітин ВНК-21, для чого після інкубування суміші досліджуваного та стандартного антигену з антирабічними антитілами до суміші як еталонного

вірусу сказу додають вірус сказу штаму CVS, а як чутливу до вірусу сказу культури клітин додають перещеплювану культуру клітин.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перещеплювану культуру клітин вибирають з групи L929, 3T3 і ВНК-21.

5 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що як чутливу до вірусу сказу культури клітин вибирають перещеплювану культуру клітин ВНК-21.

4. Спосіб за будь-яким з пунктів 1-3, який **відрізняється** тим, що здійснюють попереднє приготування реакційної суміші з подальшим внесенням суспензії клітин.

10 5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що в 96-лунковому планшеті з дванадцятьма вертикальними та вісьмома горизонтальними від А до Н рядами лунок паралельно до всіх лунок вносять поживне середовище, до лунок від першої до четвертої включно ряду А вносять стандартну антирабічну вакцину, в лунки від п'ятої до восьмої включно та від дев'ятої до дванадцятої включно рядів А та Е вносять досліджувані вакцини, шляхом піпетування готують двократні розведення досліджуваних і стандартної вакцин, середовище, що залишилось в

15 процесі фільтрації, видаляють з останньої лунки, в лунки від Н1 до Н4 включно вакцини не додають, готують робоче розведення стандарту антирабічного імуноглобуліну, цю суміш інкубують в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при заданій температурі, після інкубації в усі лунки планшета окрім від Н1 до Н2 включно додають вірус CVS, розбавлений живильним середовищем до активності 5000 CCID<sub>50</sub>/мл, паралельно у лунках від F1 до H2 включно готують чотири послідовних

20 п'ятикратних розведення вірусу CVS, планшети залишають для інкубування в умовах CO<sub>2</sub>-інкубатора при заданій температурі з 5 % CO<sub>2</sub> в атмосфері, далі до реакційної суміші в усі лунки планшета вносять суспензію дводобової культури клітин ВНК-21 в концентрації 2,5 млн клітин/мл, при цьому в лунках Е1-Е4 включно контролюють ростові властивості культури клітин, через період часу біля 48 годин культивування моношар клітин фіксують охолодженням 85 %

25 ацетоном біля 30 хвилин, після фіксації моношар фарбують та візуалізують за допомогою флюорисцентного мікроскопа і здійснюють облік за позитивними лунками, в яких розмноження вірусу не пригнічене в результаті впливу вільних нейтралізуючих антитіл, при цьому здійснюється підрахунок полів зору в лунці, під час якого в кожній лунці переглядають послідовні поля зору, і як позитивні відзначають поля, що містять хоча б один фокус, що

30 флуоресцює.

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

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