



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 146204

(13) U

(51) МПК

A61K 39/145 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 05131**

(22) Дата подання заявки: **07.08.2020**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **28.01.2021**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **27.01.2021, Бюл.№ 4**

(72) Винахідник(и):

**Рула Олександр Миколайович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Музика Денис Васильович (UA),
Стегній Антон Борисович (UA),
Ткаченко Семен Володимирович (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ГРИПУ А ПІДТИПІВ Н5 ТА Н7 В РЕАКЦІЇ ЗАТРИМКИ ГЕМАГЛЮТИНАЦІЇ (РЗГА)

(57) Реферат:

Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА) містить антиген вірусу грипу птахів А/курка/Сиваш/02/05 (Н5N1) та в залежності від епізоотичної ситуації використовуються виробничі штами вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7: А/крячок/Південна Африка/61 (Н5N3), А/курка/Росія/87 (Н7N1), А/чирянка/Джанкой/ 4-17-11/2010 (Н5N2), А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011 (Н7N3), гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 (Н5N8).

UA 146204 U

UA 146204 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, діагностики та біотехнології і може використовуватись при виробництві тест-системи для серологічної діагностики грипу у сільськогосподарських, диких тварин та птахів в реакції затримки гемаглютинації.

На сьогоднішній день вірус грипу залишається непередбачуваною інфекцією для тварин, птиці та людей. Однією з складових боротьби з високопатогенним грипом птиці є своєчасна діагностика захворювання. Виявлення антигемаглютининів (антитіл) в сироватці крові та в інших біологічних рідинах (жовток яєць) є доказом існуючої чи минулої інфекції у тварин та птахів.

Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА) є класичною серологічною реакцією, рекомендованою Міжнародним епізоотичним бюро (МЕБ) та Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) для серологічної діагностики грипу у тварин, птахів та людей. Використання РЗГА дозволяє проводити діагностику, серологічний моніторинг та на основі отриманих результатів прогнозувати епізоотичну ситуацію.

На сьогодні використання класичного методу діагностики як РЗГА, який є "золотим стандартом", в системі контролю грипу, є обов'язковим. Для підтримки високої специфічності тест-систем необхідно постійно удосконалювати технологічний регламент виготовлення та контролювання тест-систем, а, головне, оновлювати виробничі штами за рахунок використання актуальних епізоотичних штамів, які циркулюють на відповідній території. Окрім того, МЕБ рекомендує використовувати у складі тест-систем для діагностики низькопатогенні штами замість високопатогенних.

Існує тест-система, в якій як антиген міститься інактивованій вірус А/свиня/Айова/15/30. Цей діагностикум використовується для діагностики грипу свиней [заявка на изобретение № 93012074/13 Набор для диагностики гриппа свиней / Суздальцева М.А., Исаченко В.А., дата подачи заявки 30.03.1993]. Недоліком є те, що діагностикум використовується тільки для діагностики грипу свиней. Крім цього, використовується застарілий штам 1930 року виділення.

Існує "АвіФлуТест H5N1-Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу H5N1 в реакції затримки гемаглютинації" (Патент Україна № 25752 27.08.2007. Бюл. № 13 2007). Це рішення може бути прийняте за найближчий аналог. Недоліком є те, що тест-система містить антиген вірусу грипу одного підтипу - H5. Це не дає можливості проводити діагностику підтипу H7.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити "Тест-систему для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів H5 та H7 в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА)", що містить антиген вірусу грипу птахів H5N1А/курка/Сиваш/02/05, шляхом використання в залежності від епізоотичної ситуації виробничих еталонних штамів вірусу грипу А підтипів H5 та H7: А/крячок/Південна Африка/61 (H5N3) та А/курка/Росія/87 (H7N1), А/чирянка/Джанкой/4-17-11/2010 (H5N2), А/крижень/Асканія-Нова/23-15-02/2011 (H7N3), гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 (H5N8).

Зазначені виробничі штами вірусу задепоновані у Національному центрі штамів мікроорганізмів при Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ.

Заміна та/або введення додаткових нових виробничих штамів (антигенів) з новими антигенними формулами (підтипами гемаглютиніну, нейрамінідази) може здійснюватись з урахуванням епізоотичної ситуації, антигенних формул циркулюючих епізоотичних низько-та/або високопатогенних вірусів грипу. Ця тест-система схожа з вищепереліченими аналогами, але, по суті, являє собою нову, в якій як антигени використовуються актуальні на цей час штами вірусу грипу H5 та H7, що відповідає критерію "новизна".

До складу тест-системи входять наступні компоненти:
антигени вірусу грипу А підтипів H5 та H7 інактивовані, сухі;
позитивні контролю з антитілами до вірусу грипу А підтипів H5 та H7, сухі;
негативний контроль без антитіл до вірусу грипу А, сухий;
набір солей для виготовлення фосфатно-сольового буфера (натрій фосфорнокислий двозаміщений (Na_2HPO_4), натрій фосфорнокислий однозаміщений (NaH_2PO_4), натрій хлористий (NaCl)).

Приклад 1.

Постановка реакції гемаглютинації (РГА): для постановки реакції гемаглютинації (РГА) готують дворазові розведення антигенів (H5-H5N3 А/крячок/Південна Африка/61; H7-H7N1 А/курка/Росія/87) від 1:2 до 1:4096. Для цього в усі лунки планшета з V-подібною формою дна розливали ФСБ в об'ємі $0,025 \text{ см}^3$. У першу лунку вносили рівний об'єм антигену (H%, H7), трикратно піпетували і переносили по $0,025 \text{ см}^3$ у другу лунку і т. д. Із останньої лунки $0,025 \text{ см}^3$ суміші видаляли у дезінфекційний розчин. Після цього в усі лунки вносили 1 % суспензію еритроцитів півнів у об'ємі $0,025 \text{ см}^3$. Планшет обережно струшували і залишали на 30 хв. за кімнатної температури (20-25)°C.

Облік реакції проводили з нижньої частини планшета при його обережному нахиленні, при цьому в лунках, де відсутня гемаглютинація (чітко сформований гудзик еритроцитів з просвітленням рідини навколо нього) буде спостерігатися "гудзик, що швидко стікає" відразу після нахилу планшета як в контролі еритроцитів. В лунках, де є гемаглютинація (чітко сформована "парасолька", або "парасолька" з невеликим гудзиком), при нахилі стікання відсутнє. За титр антигену приймали його найбільше розведення, в якому чітко виражена гемаглютинація (осідання еритроцитів у вигляді "парасольки", "парасольки" з гудзиком, який не стікає, чи стікає не повністю без просвітлення рідини). Гемаглютинуюча активність антигенів (H5, H7) становить $6 \log_2$ та $8 \log_2$ (1:64 та 1:256), що вказує на їх активність.

Приклад 2.

Постановка РЗГА: в усі лунки V-подібного планшета вносили фосфатно-сольовий буфер (ФСБ, pH 7,2±0,1) в об'ємі 0,025 см³. У перші лунки додавали рівний об'єм польових сироваток (сироватка крові), трикратно піпетували і робили послідовні двократні розведення (від 1:2 до 1:4096). Далі в усі лунки планшета вносили антигени (H5, H7) у робочому розведенні (4 ГАО) в об'ємі 0,025 см³ та витримували за кімнатної температури 20 °C впродовж 30-40 хв., після чого додавали 1 % суспензію еритроцитів півнів у об'ємі 0,025 см³.

Постановку РЗГА супроводжували контролями: негативний, позитивні контролю H5 та H7 (підготовка та постановка як і польові сироватки), контроль робочої дози 4 ГАО, контроль на спонтанну аглютинацію еритроцитів півня (0,025 см³ ФСБ + 0,025 см³ 1 % суспензії еритроцитів півня) та контроль на ізоаглютинацію (0,025 см³ сироватки + 0,025 см³ ФСБ + 0,025 см³ 1 % суспензії еритроцитів півня). Планшет обережно струшували і для осадження еритроцитів залишали на 40 хв. за кімнатної температури (20-25 °C), після чого проводили облік реакції. Облік РЗГА проводили при обережному нахиленні планшета. За титр антитіл приймали найбільше розведення сироватки, яке викликає повну затримку гемаглютинації антигену ("гудзик" еритроцитів повністю стікає при нахилі планшета). Одночасно ставили контроль еритроцитів на спонтанну аглютинацію (1 % суспензія еритроцитів та фосфатно-сольовий буфер у рівних об'ємах по 0,025 см³). Аглютинація була відсутня.

За титр антитіл вважали найбільше розведення сироватки, яке повністю затримувало аглютинацію еритроцитів (див. таблицю).

Так, антитіла до грипу H5 були виявлені у сироватках крижнів № 7 та № 10-1:32 та 1:16. До вірусу грипу H7 були виявлені антитіла у сироватках крові крижнів № 7 та № 8-1:8 та 1:16. Позитивні сироватки H5 та H7 затримували гемаглютинуючу активність відповідних антигенів (H5, H7) у титрі 1:256 та 1:1024. З негативною сироваткою спостерігалася аглютинація еритроцитів. Отримані результати вказують на активність та специфічність позитивних сироваток крові використаної тест-системи.

Таким чином, тест-систему доцільно використовувати для серологічної діагностики грипу у сільськогосподарських, свійських, диких тварин та птахів.

Таблиця

Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів H5 та H7 в реакції затримки гемаглютинації (РЗГА)
Результати РЗГА щодо наявності антитіл до вірусу грипу А підтипів H5 та H7 в сироватках крові птиці

Номер сироватки крові	H5	H7
	Наявність антитіл	
1 (курка-несучка)	-*	-
2 (курка-несучка)	-	-
3 (курка-несучка)	-	-
4 (курка-несучка)	-	-
5 (курка-несучка)	-	-
6 (крижень)	-	-
7 (крижень)	1:32	1:8
8 (крижень)	-	1:16
9 (крижень)	-	-
10 (крижень)	1:16	-

Продовження таблиці

позитивний контроль Н7	-	1:1024
позитивний контроль Н5	1:256	-
негативний контроль	-	-
контроль еритроцитів	аглютинація відсутня	

Примітка. "*" - антитіла відсутні

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Тест-система для виявлення антитіл до вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7 в реакції затримки
гемаглютинації (РЗГА), що містить антиген вірусу грипу птахів А/курка/Сиваш/02/05 (Н5Н1), яка
відрізняється тим, що додатково в залежності від епізоотичної ситуації використовують
виробничі штами вірусу грипу А підтипів Н5 та Н7: А/крячок/Південна Африка/61 (Н5Н3),
А/курка/Росія/87 (Н7Н1), А/чирянка/Джанкой/ 4-17-11/2010 (Н5Н2), А/крижень/Асканія-Нова/23-
10 15-02/2011 (Н7Н3), гуска білолоба/АН/1-15-12/2016 (Н5Н8).