

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології і стосується культивування культури клітин FLK-BLV для отримання антигену вірусу лейкоза великої рогатої худоби, який використовується для серологічної діагностики лейкозу великої рогатої худоби.

Культивування культури клітин FLK-BLV [Van Der Maaten M.J., Miller J. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cultures. // Bibl. Haematol, 1976. Vol. 43. - P. 360-362], яка хронічно інфікована вірусом лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ), здійснюється на суміші живильних середовищ Ігла та 199 з 10% нормальної сироватки крові великої рогатої худоби [Стегний Б.Т., Явников Н.В., Горбатенко С.К. и др. Концентрирование и очистка вируса лейкоза крупного рогатого скота. - Вет. Медицина.: Міжвід. темат. наук. зб. - X., 2000. - Вип. 80. - С. 579].

При накопиченні вірусів з використанням клітин, наявність специфічних антитіл у сироватці крові знижує інфекційний титр вірусів, а іноді взагалі перешкоджає їх реплікації в клітинах [Патент 58727 А Україна, МКІ А61М1/00, № 2002097159. Заявлено 03.09.2001; Опубл. 15.08.2003, Бюл. № 8]. Тому для підвищення виходу ВЛ при культивуванні культури клітин FLK використовують, нормальну сироватку крові ВРХ попередньо перевірену на відсутність специфічних антитіл, або аглобулінову сироватку крові ВРХ, або коней, або північних оленів [А.С. 1585951 А СССР, класс А61К39/12. / Цымбал В.И., Киприч В.В., Бусол В.А. и др. Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии. № 4627393/30-13. Заявлено 27.12.1988. Патент 2020960 Россия, класс А61К39/12 / Сорокина А.А., Шевирев Н.С., Валихов А.Ф. и др. Способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота" № 5054873113. Заявлено 15.07.1992. Опубл. 15.10.1994. Бюл. № 19]. Виготовлення аглобулінової сироватки ВРХ, а також використання для культивування культури клітин FLK-BLV сироватки крові коней та північних оленів потребує додаткових грошових витрат, що є недоліком.

Сироватка крові птиці не містить специфічних до вірусу лейкозу ВРХ антитіл, тому використання сироватки крові птиці для отримання антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби є актуальним.

Прототипом способу, що патентується, є "Способ получения антигена для диагностики вируса лейкоза" [А.С. 1585951 А СССР, класс А61К39/12. / Цымбал В.И., Киприч В.В., Бусол В.А. и др. Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии. № 4627393/30-13. Заявлено 27.12.1988], де накопичення антигену ВЛ проводилось культивуванням культури клітин FLK-BLV з використанням живильного середовища Ігла, гемогідролізату, сироватки крові ВРХ, глютаміну та антибіотиків. Основним недоліком культивування культури клітин FLK-BLV за цим способом є використання нормальної сироватки крові великої рогатої худоби, яку необхідно обов'язково перевіряти на наявність специфічних до вірусу лейкозу антитіл у реакції імунодифузії (РІД). Відомо, що в РІД не виявляються антитіла в низьких концентраціях, а використання сироватки з ВЛ-антитілами при виробництві лейкозного діагностичного негативно впливає на його активність.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб культивування культури клітин FLK-BLV, що містить культивування культури клітин на суміші живильного середовища Ігла гемогідролізату з сироваткою крові, глютаміну та антибіотиків, шляхом додавання до суміші середовища 199 та використання сироватки крові птиці, щоб забезпечити спосіб культивування культури клітин FLK-BLV.

Спосіб виконується таким чином: суспензію клітин FLK, яка хронічно інфікована вірусом лейкозу великої рогатої худоби, у концентрації 148-152 тис. клітин/см³ висівають у рідке живильне середовище, що містить: середовище Ігла - 43-47%, середовище 199 - 38-42%, сироватку крові птиці - 14-16%, глютамін 0,09-0,1%, а також 99-102 МЄ/см³ натрієвої солі пеніциліну та сульфату стрептоміцину. Культуру інкубують на протязі 5-7 діб при (37±0,5)°С без зміни середовища. Клітини знімають зі скла загальним методом та використовують для пересіву. Перещеплювання культури FLK-BLV здійснюється до 30-50 пасажів. Далі культуральна біомаса, яка вміщує антигени ВЛ, концентрується. Після цього її перевіряють на специфічність та активність у РІД.

Приклад 1.

При дослідженні ростових властивостей різних серій сироватки крові птиці, в порівнянні з нормальною сироваткою крові великої рогатої худоби та аглобуліновою, суттєвої різниці не було. Строки формування моношару в експерименті та в контролі співпадали, а також не відрізнялись морфологією клітин.

Приклад 2.

Після концентрування вірусних зразків перевірка активності при використанні нормальної сироватки ВРХ у РІД склала $(1,3 \pm 0,4) \log_2$, аглобулінової сироватки ВРХ - $(1,8 \pm 0,5) \log_2$, сироватки птиці - $(2,2 \pm 0,3) \log_2$.

Запропонований спосіб культивування культури клітин FLK з використанням сироватки крові птиці дозволяє отримати більш активний $((2,2 \pm 0,3) \log_2$ в РІД) антиген вірусу лейкозу ВРХ. Сироватка крові птиці може використовуватися в технології виробництва антигену вірусу лейкозу.