

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології і може бути використана для вирощування клітинних культур та накопичення вірус - культуральної біомаси.

Сироватка крові є необхідним компонентом живильних середовищ для культивування клітинних культур. Вона слугує джерелом поживних речовин, приймає участь у процесах адгезії, розшарування, росту і розмноження клітин, сприяє зв'язуванню та детоксикації пірогенів, токсинів, а також продуктів метаболізму клітин. Найбільш універсальною для культивування клітин є сироватка крові плодів корови, але дефіцит та висока вартість не дозволяють її широко використовувати. Суттєвим недоліком сироваток дорослих тварин є наявність в них специфічних антитіл та інших інгібіторів, здатних негативно впливати на процеси культивування клітин і вірусів.

Використання сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ), вільної від  $\gamma$ -глобулінів дозволяє збільшити інфекційні титри вірусів при індикації та накопиченні їх на культурі клітин.

В Україні сироватка крові ВРХ виготовляється виробниками без очищення від специфічних антитіл.

Існує "Способ получения ростовых протеинов из сывороток крови различных видов животных" [Патент RU №2112799 кл. C12N5/02 Опубликовано: 1998.06.10]. Ростіві протеїни одержують із сироватки крові тварин за допомогою дворазової обробки ПЕГом до кінцевої концентрації 5,0-7,5% і після підкислення розчином соляної кислоти концентрацію ПЕГа доводять до 18-20%. Препарат піддають триразовому заморожуванню та відтаванню, після чого сушать або залишають у рідкому стані.

Існує "Способ очистки сыворотки крови крупного рогатого скота" [Л.И. Игудин, С.Д. Орлов, Н.В. Шалунова и др. // Вопр. вирусологии. - 1980. №5. - С. 640]. Для очищення від  $\gamma$ -глобулінової фракції білків сироватку крові ВРХ обробляють стерильним 40% розчином поліетиленгліколю (ПЕГ) з мол. м. 5500-7000 (фірма "Serva", ФРГ), кінцеву концентрацію якого у сироватці доводять до 6-8%. Після експозиції 16-18 годин при температурі +4°C сироватку центрифугують при 2000-3000об./хв. протягом 20 хвилин для видалення ПЕГу. Вміст білку у сироватці після обробки ПЕГом знижувався в 2 рази.

Недоліком цих способів є залишок ПЕГу у сироватці крові, що викликає інгібіцію ростової активності клітин і робить неможливим їх тривале культивування.

Існує "Способ получения сыворотки крови" [SU №1433590 кл. A61K 35/14 от 12.27.1985]. Сироватку крові отримують за допомогою збору крові в ємність, відстоюють і відділяють цільовий продукт від згустків крові. Цей спосіб може бути прототипом. Недоліком способу є те, що сироватка містить специфічні антитіла, крім того спосіб не передбачає попереднього тестування проб сироватки, які отримують від кожної тварини-донора, на наявність ознак цитотоксичності на культурі клітин, що знижує якість кінцевого продукту.

В основу корисної моделі, поставлено задачу розробити спосіб одержання сироватки крові великої рогатої худоби, вільної від специфічних антитіл, що включає збір крові, відстоювання, відділення від згустків крові та стерилізуючу фільтрацію шляхом попереднього тестування кожної проби сироватки на цитотоксичність, відділення  $\gamma$ -глобулінів ультрафільтрацією на модулях з порожнистими волокнами з розміром пор 800-1100кД, щоб забезпечити повну очистку сироватки крові від специфічних антитіл.

Спосіб виконується таким чином:

Кров від клінічно здорової ВРХ збирають у стерильні, профламбовані спиртом баки. На дно додають невелику кількість фізіологічного розчину. Потім зібрану кров відстоюють 4-5 годин при 25-24°C, після чого згусток крові розрізають на декілька частин і витримують протягом 12-18 годин при +4°C. Одночасно проби сироватки від кожної тварини перевіряють на цитотоксичність на культурі клітин. При наявності ознак цитотоксичності сироватка вибраковується, якісна сироватка об'єднується в одну серію і піддається сепарації на апараті "СЦМ-500У" для звільнення від формених елементів. Від специфічних антитіл сироватку звільнюють за допомогою ультрафільтрації на модулях з порожнистими волокнами з розміром пор 800-1100кД. Якість отриманої сироватки оцінюють за наступними показниками: загальний білок, ростові властивості, наявність специфічних антитіл до вірусів лейкозу, вірусної діареї, інфекційного ринотрахеїту, стерильність, відсутність контамінації вірусами та мікоплазмами.

Порівняльний аналіз з прототипом дозволяє зробити висновок, що спосіб за яким проводять попереднє тестування кожної проби, відділення  $\gamma$ -глобулінів ультрафільтрацією дозволяє збільшити інфекційні титри вірусів при індикації та накопиченні їх на культурі клітин, що відповідає критерію "новизна".

Приклад 1.

Оцінка ріст-стимулюючої активності сироватки.

В якості тест-культур використовували лінії перещеплюваних клітин КСТ, СНЕВ, FLK-71, ВНК-21. Сироватку крові, що досліджували, додавали до живильного середовища у кількості 15% і культивували клітини впродовж п'яти послідовних пасажів. Сироватку вважали придатною, якщо вона забезпечувала у кожному пасажі формування моношару у культуральних флаконах, не викликала дегенеративних змін у клітинах (вакуолізація, велика зернистість і інш.) і забезпечувала після п'ятого пасажу дворазовий і більше приріст клітин у культуральних флаконах.

Приклад 2. Контроль стерильності.

Зразки сироватки у дозі 1см<sup>3</sup> висівали у дві пробірки тіогліколевого середовища. З кожної пари одну з пробірок, що засіяли, інкубували при температурі 35,0-37,5°C, другу при 20-23°C. Сироватку вважали стерильною, якщо на 14 добу в жодній із засіяних пробірок не спостерігалось росту.

Спосіб одержання сироватки крові великої рогатої худоби, вільної від специфічних антитіл є ефективним, не трудомістким, дозволяє повністю звільнити сироватку від  $\gamma$ -глобулінової фракції. Використання сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ), вільної від  $\gamma$ -глобулінів дозволяє збільшити інфекційні титри вірусів при індикації та накопиченні їх на культурі клітин. Одержана сироватка забезпечує стабільний ріст та проліферацію перещеплюваних клітин культур.