

Винахід, що передбачається відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології, а саме до способів одержання антигену для діагностики вірусної діареї великої рогатої худоби (ВРХ).

Існують способи одержання антигенів для діагностики вірусних хвороб тварин (SU №1585951, кл. А61К39/2, от 27.12.1988 "Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии"; SU №959425 кл. А61К39/135 от 13.02.1981 "Способ получения ящурного антигена").

Є рішення (патент России №2002110975, С12N7/01, от 25.04.2002 "Способ получения ящурного антигена типа О для иммунохимических реакций". Це рішення може бути прототипом. За цим рішенням отримують ящурний антиген наступними етапами: накопичення біомаси вірусу, використовуючи культуру клітин ВНК-21; очищення вірусомішуючої суспензії, використовуючи 10-20% хлороформ; інактивація вірусу, використовуючи аміноетілетіленемін; концентрування вірусомішуючої суспензії, використовуючи 8-10% ПЕГ-600. Це рішення не можливо використовувати для одержання антигену для діагностики вірусної діареї ВРХ.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб одержання антигену, що містить репродукцію вірусу в чутливій біологічній системі, інактивацію, концентрування та очистку вірусомішуючої сировини, шляхом використання як антигену вірус діареї ВРХ у ефективній кількості, використання перещеплюваної лінії клітин КСТ або МДВК, інактивацією вірусу 0,03% формаліном, концентруванням 6-8% ПЕГ-6000 при 18 годинній експозиції при 4°C та ультрацентрифугуванням у градієнті щільності сахарози, щоб забезпечити ефективність способу одержання антигену для діагностики вірусної діареї великої рогатої худоби.

Спосіб виконується таким чином. Для виготовлення антигену використовують вірус діареї (3-4 пасаж), культивований у перещеплених клітинах нирки (МДВК) чи коронарних судин теляти (КСТ), з титром інфекційної активності не нижче $6,0-6,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$.

Попередньо очищений низькошвидкісним центрифугуванням від клітинного детриту вірус діареї концентрують за допомогою 6-8% ПЕГ-6000 (кінцева концентрація) при 18-годинній експозиції при 4°C, або

ультрафільтрації через мембрани УАМ-300 Å на установці УФМ-3. Концентрований таким чином вірус піддають очищенню в градієнті сахарози із 2-х розчинів: 10% з щільністю $1,038 \text{ г/см}^3$ і 50% з щільністю $1,240 \text{ г/см}^3$. В градієнті щільності вірус осаджують на ультрацентрифугу при 70000g протягом 5-6 годин. В якості антигену використовують фракції з щільністю $1,101-1,174 \text{ г/см}^3$.

Приклад 1

Для приготування антигену вихідну вірусомісну культуральну рідину піддавали одноразовому заморожуванню-відтаванню.

Після цього вірусну суспензію освітляли низькошвидкісним центрифугуванням (3000об/хв.) протягом 20-30 хвилин. Надосад збирали.

В освітлену суспензію вірусу додавали при постійному перемішуванні 50% розчин ПЕГ до кінцевої концентрації 6-8% по сухій речовині. Суміш витримували протягом 16-18 годин при +4°C. Осад відділяли центрифугуванням при 5000об/хв. протягом 30-40 хвилин і ресуспендували в мінімальному обов'язково визначеному об'ємі розчину Хенкса (рН7,2-7,4).

Приклад 2

Відрізняється тим, що освітлену суспензію вірусу пропускали через мембрани УАМ-300 Å на установці УФМ. Сконцентрований на мембрані вірус знімали мінімальним обов'язково визначеним об'ємом розчину Хенкса.

Приклад 3

Розплавлений на водяній бані агар розливали по 25 см^3 у чашки Петрі з діаметром 9см чи на скляні пластинки розміром $9 \times 12 \text{ см}$. У застиглій агаровій пластинці штампами робили лунки по шестикутній системі, у якій одна лунка розташована в центрі, а шість - навколо. Діаметр кожної луночки 5мм, відстань між ними 5мм. У центральну лунку вносили вірусспецифічну сироватку, а в периферичні - розведення антигену від 1:4 до 1:128. Після постановки реакції агарові пластинки витримували у вологій камері при 37°C. Реакцію враховували через 16, 24, 48 і 72 години після її постановки. За граничний титр антигену приймали максимальне його розведення, де спостерігали позитивну реакцію.

Приклад 4

У лунки полістеролових планшет вносили по $0,1 \text{ см}^3$ розчину антивірусних імуноглобулінів у 0,015М натрій-карбонатному буфері в робочому розведенні і інкубували не менше 18 годин при 4°C, потім розчин Ig G видаляли, лунки 2 рази промивали твін-фосфатним буфером. У відмиті лунки вносили по $0,1 \text{ см}^3$ 2% розчину бичачого сироваткового альбуміну (БСА) і інкубували 2-3 години при 37°C. Потім лунки знову промивали 2-3 рази й у кожну лунку вносили досліджувані розтитровані антигени, а також за відомо позитивні і негативні антигени в робочому розведенні (по $0,1 \text{ см}^3$). Планшети інкубували при 37°C протягом 1,5-3 годин, після чого лунки відмивали 4 рази твін-фосфатним буфером. У відмиті лунки вносили по $0,1 \text{ см}^3$ антивірусного пероксидазного кон'югату в робочому розведенні, інкубували 1-1,5 години при 37°C. Після інкубування лунки ретельно відмивали 4-6 разів твін-фосфатним буфером і висушували 10 хвилин при кімнатній температурі. Після цього в лунки вносили субстрат суміш (по $0,1 \text{ см}^3$), витримували 20 хвилин у темноті при кімнатній температурі. Відразу після цього реакцію зупиняли внесенням 2н розчину сірчаної кислоти. Реакцію враховували візуально чи за допомогою спектрофотометру при довжині хвилі 490нм.

Пробу вважали позитивною, якщо середнє значення реєструємої оптичної щільності продукту пероксидазної реакції перевищувало значення для негативного стандарту не менш, ніж у 2 рази.

При візуальній оцінці результатів реакції інтенсивність фарбування продукту пероксидазної реакції порівнювали з інтенсивністю фарбування, отриманої для позитивного і негативного стандарту в тих же розведеннях.

Цей спосіб дозволяє отримати високо очищений і специфічний антиген вірусу діареї для використання в ІФА і РДП при діагностиці вірусної діареї ВРХ.