



УКРАЇНА

(19) UA (11) 27375 (13) U

(51) МПК (2006)

A61K 39/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) u200707335

(22) 02.07.2007

(24) 25.10.2007

(72) НАГАЄВА ЛЮБОВ ІЛЛІВНА, UA, АРАНЧІЙ
СЕРГІЙ ВАСИЛЬОВИЧ, UA, ДОБРОСОЛ
ГРИГОРІЙ ІЛЛІЧ, UA, НАГАЄВ ЄВГЕН
МИКОЛАЙОВИЧ, UA, НАГАЄВА ГАЛИНА
ГРИГОРІВНА, UA(73) НАУКОВО-ВИРОБНИЧЕ ТОВАРИСТВО З
ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ

"ЛЕЙКОНАД", UA

(56)

(57) Спосіб отримання антигену для тестування лейкозу великої рогатої худоби, що включає культивування хронічно інфікованої культури FLK вірусом лейкозу великої рогатої худоби на поживному середовищі, відділення культуральної рідини, отримання клітинної маси, концентрування отриманого антигену з його доконцентруванням до заданого позначення білка, який **відрізняється** тим, що як поживне середовище використовують середовище Ігла та сироватку крові великої рогатої худоби, яка містить антитіла до вірусу лейкозу, взяті в співвідношенні 1:1.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до способу отримання антигену для тестування лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) із віруспродукуючої культури FLK.

З метою істотного обмеження поширення небезпечного захворювання ретровірусної природи, такого як лейкоз ВРХ є необхідністю створення специфічних проєктивних вакцинних препаратів, які в організмі тварин сприяють специфічному запобіганню ретровірусам.

При контролі імунологічного стану тварин та при вивченні ефективності застосування вакцин у якості діагностиків при розробці високочутливих імунологічних експрес-способів з використанням серологічних реакцій є наявність антигенів і сироваток.

Відомий спосіб отримання антигену вірусу лейкозу ВРХ при культивуванні віруспродукуючих клітин FLK на поживному середовищі, в якості якого використовують середовище Ігла, а також 10% нативну сироватку крові ВРХ, бензилпеніцилін, натрієву сіль та L-глутамін у термостаті у матрацах при температурі +37+1°C протягом 48÷72 годин, відділення культуральної рідини та її концентрування за допомогою ультрафільтраційного апарату на порожнистих волокнах. Отриманий концентрований антиген змішують з 3% карбоксинетилцелюлозою у співвідношенні 1:1. Готовий антиген фасують у флакони і ліофілізують [Див. "Інструкцію по виготовленню і контролю

діагностика "Лейкопол" наукового товариства з обмеженою відповідальністю "Лейкопол", 2003р.].

До недоліків даного способу відноситься те, що він не забезпечує повного відділення антигену з віруспродукуючої культури та його високу концентрацію. При цьому, антиген містить білкові баластні сполуки, після введення відповідної вакцини виявляє тільки наявність в крові тварин специфічні антитіла до вірусу лейкозу і не дозволяє при цьому дати оцінку імуногенній активності вакцини.

Найбільш близьким, обраним в якості найближчого аналога є спосіб отримання антигену для тестування лейкозу ВРХ, який включає культивування хронічно інфікованої культури FLK вірусом лейкозу ВРХ на поживному середовищі, відділення культуральної рідини, її адсорбційну рідинну хроматографію, концентрування отриманого антигену і його доконцентрування до заданого позначення білка. Антиген доконцентровують діалізом, ультрацентрифугуванням або в ультрафільтраційному мембранному апараті [див. патенту країни №8221, МПК7 А61К39/12, бюл.№7, 2005р.].

Спосіб забезпечує високу ступінь очистки антигену і його широке використання в реакції імунодифузії у гелі при проведенні імуноферментного аналізу, імуносенсорного способу лейкозу ВРХ та в інших сучасних способах діагностики. Однак основним його

(13) U

(11) 27375

(19) UA

недоліком остається неможливість використання для оцінки імуногенної активності вакцини проти лейкозу ВРХ.

В основу корисної моделі поставлено завдання одержання антигену для проведення диференційної діагностики наявності поствакцинальних антитіл у імунізованих тварин та визначення імуногенної активності вакцини.

Поставлене завдання вирішується в способі отримання антигену для тестування лейкозу ВРХ, який дозволяє в сироватці крові тварин імунізованих вакциною рідкою інактивованою адсорбованою проти лейкозу ВРХ професора Нагаєвої Л.І. виявити антитіла, викликані польовим штамом вірусу (gr-51) та вакцинним штамом (р-24).

Технічним результатом корисної моделі є можливість тестування напруженості імунітету ВРХ після введення вищевказаної вакцини.

Заявляємий спосіб включає культивування на поживному середовищі хронічно інфікованої вірусом лейкозу ВРХ культури FLK, відділення культуральної рідини, отримання клітинної маси, концентрування отриманого антигену з його доконцентруванням до заданого позначення білка. Було встановлено, що для отримання поставленого завдання доцільно в якості поживного середовища для культивування клітин FLK використовувати середовище Ігла та сироватку крові ВРХ, яка містить антитіла до вірусу лейкозу, взяті в співвідношенні 1:1. Заявлене співвідношення є оптимальним, так як при зменшенні співвідношення середовища Ігла та сироватки різко втрачається чутливість реакції та кількість отримання антигену, а збільшення їх кількості не впливає на вихід кількості антигену.

Спосіб реалізують наступним чином. Віруспродукуючі клітини FLK культивують на ростовому поживному середовищі, що містить поживні середовища Ігла та 199 в рівних співвідношеннях з додаванням натрієвої солі бензілпеніциліну та L-глутаміну, що містить сироватку крові ВРХ з антитілами до вірусу лейкозу протягом 8 діб до повного виснаження культуральної рідини. Культуральну рідину і дезінтегровані клітини культури FLK центрифугують при 1500об/хвил. протягом 20 хвилин. Надсадкову культуральну рідину зливають. Отриману клітинну масу відмивають фізіологічним розчином і заморожують. Далі клітинну масу розморожують з послідовним трикратним заморожуванням та розморожуванням, потім її механічно руйнують в гомогенізаторі з додаванням лікуючого буферу, взятих в співвідношенні 1:1. Отриману суміш лізують на магнітній мішалці при температурі 4°C 30хвилин. Далі суміш центрифугують при 3000об/хвил. 20хвил. Отримана надсадкова рідина утримує білок р-24, кількість якого визначають за допомогою рефрактометра RL-3.

Вміст його повинен бути більше 5мг/см. Далі антиген концентрують способом діалізу через плівку поліетиленгліколю або ліофілізують. Ліофілізований антиген р-24 має вигляд сіро-жовтого порошку.

Специфічну преципітуючу сироватку з р-24 антитілами для тестування отримують від гіперімунованих донорів ВРХ через 2 місяці після третього введення вакцинного препарату.

Контроль гуморального статусу вакцинованих тварин визначають через 30днів після останнього щеплення за допомогою реакції імунодіфузії в агаровому гелі використовуючи отриманий антиген р-24 та специфічну преципітуючу сироватку з р-24 антитілами, взятих в співвідношенні 1:1. Постановку реакції імунодіфузії здійснюють за загальноприйнятою методикою постановки РІД. Як показують проведенні дослідження лінії преципітації чіткі, молочного кольору (припустима незначна опалесценція до лунки з антигеном). Титр антитіл знаходиться у межах 1:4-1:64, що свідчить про належну напругу імунітету до вірусу лейкозу ВРХ. У імунованих тварин позитивна реакція в середньому знаходиться в межах 80-85%.