



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 3793

(13) U

(51) 7 C12N7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АУЛЕРГІНУ ДЛЯ ПРИЖИТТЄВОГО ВІЯВЛЕННЯ СВИНЕЙ-ВІРУСОНОСІВ
ПРИ ХВОРОБІ АУЕСКІ

1

(21) 2004031939

(22) 16.03.2004

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Сербіненко Тетяна Миколаївна, Цимбал Олександр Михайлович, Соловійов Сергій Тихонович, Самойлюк В'ячеслав Володимирович

2

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб одержання аулергіну, що включає репродукування на культурі клітин вірулентного вірусу, відділення клітинного детриту, консервацію, концентрацію і інактивацію вірусу, який **відрізняється** тим, що суміш вірусу та хімічно чистого гліцерину інактивують стерилізацією текучим паром, з температурою 120°C протягом 30хв.

Корисна модель, що передбачається, відноситься до вірусології, зокрема до галузі виготовлення специфічних антигенів для діагностики хвороби Ауескі і може бути використана в ветеринарній медицині.

Відомий спосіб виготовлення алергену, який передбачає концентрацію вірусу хвороби Ауескі, репродукованого на первинних клітинах курячих фібробластів, шляхом обробки його 96° етанолом при -6°C, центрифугування при 8000об/хв 30хв. та розчинення осаду в фізіологічному розчині, який представляє 1/15 частину первинного об'єму, з послідовним змішуванням у відношенні 1:1 та доданням мертиоляту в кінцевій концентрації 1:2000 (Йотов М., Вет. мед. науки, 1969, №3). Недоліком цього способу є неспецифічність реакції, та слабка активність його для інфікованого молодняка і для дорослих свиней через 90 і більше днів після їх перехворювання, а також певна складність виготовлення препарату.

Відомий спосіб виготовлення алергену з вірусу хвороби Ауескі, який репродукували в моношарових культурах курячих фібробластів або на клітинах свинячого походження (PK-15, ПП, ST), звільняли від клітинного детриту центрифугуванням, одержували алергеноактивні речовини фізичними та хімічними способами, а саме трьохкратним замороженням і відтаванням та прогріванням при 56°C протягом 3-х годин (MACSARI E. et al. Acta Vet Himg. 1974, 26, 331-334). Недоліком цього способу є низька активність алергену, що обумовлювало незбжність результатів алергічної проби з серологічними тестами, невиявлення сенсibiliзації до вірусу хвороби Ауескі, а також наявність у деяких алергенів антигенних властивостей, які

спонукали організм до сероконверсії.

Найбільш близьким до корисної моделі, що передбачається, є (Спосіб одержання алергену з вірусу хвороби Ауескі. Дек.патент №28999А кл. C12N7/00). Спосіб включає репродукування на культурі клітин вірулентного вірусу, відділення клітинного детриту, консервацію, концентрацію та інактивацію вірусу. Недоліком цього способу є застосування для виготовлення алергену репродукованого на гетерологічній для свиней тканинній культурі (курячих фібробластах) та додавання до препарату хімічних речовин, що може викликати неспецифічні реакції, а також певна складність виготовлення препарату. Цей спосіб може бути прототипом.

В основу корисної моделі, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб одержання аулергіну, що включає репродукування на культурі клітин вірулентного вірусу, відділення клітинного детриту, консервацію, концентрацію та інактивацію вірусу шляхом інактивації вірусу стерилізацією текучим паром, прогріванням при 120°C протягом 30хв. та додаванням хімічно чистого гліцерину, щоб забезпечити одержання аулергіну для прижиттєвого виявлення свиней вірусоносців при хворобі Ауескі. Сукупність перелічених ознак дає можливість зробити висновок, що рішення, яке заявляється, відповідає критерію "новизна".

Спосіб одержування аулергіну виконували таким чином.

Аулергін готували з вірулентного вірусу хвороби Ауескі, репродукованого на гомологічній для свиней перешеплюваній лінії СНЕВ (свиняча нирка ембріональна версифікована), який після звільнення його від клітинного детриту центрифугуванням

(13) U

(11) 3793

(19) UA

його при 2500-3000об/хв протягом 30хв., концентрували осадженням ПЕГ-6000 шляхом додавання його у вірусовміщуючу рідину до кінцевого вмісту 10% і витримували при температурі 4+6°C протягом 18-24 годин з послідовним центрифугуванням при 2500-3000об/хв. протягом 30-40хв., і розчиненням осаду в забуферному фізіологічному розчині (рН7,2) в об'ємі меншому в 10 разів за початковий об'єм вірусотримуючої рідини, після чого до концентрованого вірусу добавляли рівну кількість хімічно чистого гліцерину і ця суміш прогрівалась при температурі 120°C протягом 30-40хв.

Приклад 1

Культуру перещеплюваних клітин лінії СНЕВ, що вирощена у вигляді моношару в 3-х матрасах об'ємом на 1500см³ кожний на ростовому живильному середовищі (середовище 199, яке утримувало 10% сироватки крові великої рогатої худоби і антибіотики - пеніцилін по 100од/см³ та стрептоміцин по 100мкг/см), після зміни ростового середовища на підтримуюче (середовище 199 з антибіотиками) заражали вірусом хвороби Ауескі штам "УНИИЭВ18в" 16 пасажу на клітинах лінії СНЕВ з множиною зараження 0,5 ТЦД 50/ клітин. Заражені клітини в матрасі інкубували в стаціонарному положенні в термостаті при температурі 37°C до повної дегенерації і сповзання клітинного моношару внаслідок цитопатичної дії вірусу, що відбулась за 36 годин після зараження (титр вірусу при послідовній титрації на кролях-10 ЛД₅₀/см³).

Одержаний вірус центрифугували при 3000об/хв. протягом 30хв. Надосадову рідину зібрали в один флакон ємністю 500см³, а осад знешкодили шляхом автоклавування при 2атм. (+132°C) протягом 2-х годин. Для концентрації вірусу використовували ПЕГ-6000. З цією метою виготовили 50% розчин ПЕГ на стерильній дистильованій воді. Для кращого розчинення підігріли до 40°C, потім фільтрували через ватно-марлевий фільтр та стерилізували при 120°C протягом 30хв. Суміш вірусу з ПЕГ-6000 виготовляли з розрахунку: до 400см³ центрофугованого вірусу добавили 100см³ стерильного 50% розчину ПЕГ. Цю суміш ретельно збовтали і витримали 4+6°C протягом 24 годин. Після цього суміш вірусу і ПЕГ центрифугували при 3000об/хв протягом 30хв. Надосадову рідину злили і знешкодили автоклавуванням при 2атм. (132°C) протягом 2-х годин. До осаду добавляли фізіологічний розчин аСІ з рН7,2 в кількості 40см³, тобто в 10 разів менше, ніж було взято початкового вірусу. Для розчинення осаду його витримували при кімнатній температурі 2 години, потім центрифугували при 3000об/хв протягом 30хв., осад відкинули і знешкодили, а до надосадової рідини, яку зливали в одну ємність (40см³ титром вірусу, що визначався при послідовній титрації 10⁻⁹ ЛД₅₀/см³ для кролів), добавляли таку ж кількість стерильного хімічно чистого гліцерину (стерилізація його проводилась напередодні при 120°C протягом 40хв.) Суміш концентрованого вірусу з гліцерином (80см³) інактивували стерелізацією текучим паром при температурі 120°C 30хв.

Після закінчення інактивації ємність з остуженим вірусом (аулергіном) ретельно збовтували і із неї, з метою перевірки стерильності, зробили висіви в 3 пробірки з МПА, МПБ і МПБ під вазеліновим маслом і агар Сабура в дозі по 0,3см³. Висіви витримували протягом 14 діб в термостаті при температурі 37°C, а висіви на агар Сабура - при температурі 22+24°C. Всі висіви були стерильні. Крім того, відібрали пробу аулергіну в кількості 3см³, яку для перевірки шкідливості ввели двом кролям масою 1,8-2кг, підшкірно на боковій поверхні тулубу в дозі 1см³. При спостереженні протягом 10 діб кролі залишались живими та здоровими, тобто аулергін був нешкідливим. Після цього аулергін розфасували стерильною піпеткою в добре промиті стерильні флакони по 10см³, герметично закрили гумовими пробками і закатали алюмінієвими ковпачками.

Приклад 2

Аулергін являє собою прозору та безбарвну рідину. Відсутність дермотоксичних, антигенних та сенсibilізуючих властивостей у виготовленого аулергіну перевірили в одночасному досліді на 2-х інтактних підсвинках вагою по 50кг і ввели аулергін внутрішньошкірно в основі вуха в дозі 0,2см³. Через 3 тижні після цього у тварин взяли кров, сироватку якої дослідили в РН ВХА. Після цього тваринам повторно ввели аулергін внутрішньошкірно в основу вуха в дозі 0,2см³. Результати досліджень свідчили про відсутність у аулергіну дермотоксичних, антигенних та сенсibilізуючих властивостей, оскільки змін в шкірі на місці введення аулергіну не було, ВН-антитіла не виявлялись, шкірна реакція на повторне введення аулергіну була негативною. Специфічну активність аулергіну визначали на 4-х підсвинках масою 50кг, яких на 3 тижні до цього сенсibilізували до вірусу хвороби Ауескі введенням її в м'язи стегна в дозі 2см³. Через 24 години у всіх тварин на шкірі в місці введення аулергіну виявлено рожеву пухлинисту до 20мм в діаметрі, болючість, некроз епідермісу, тобто позитивну реакцію, що свідчило про виражену специфічну активність препарату.

Приклад 3

Спосіб одержання аулергіну здійснювався, як описано вище, однак, для виготовлення препарату застосовувався вірус з титром 10^{-8,5} ТЦД 50/см³ до його концентрації і прогрівання його при температурі 100°C протягом 40 хвилин. Одержаний аулергін (всього 470мл) при перевірці, як описано вище, був стерильним, нешкідливим, у нього були відсутні дермотоксичність, антигенність та сенсibilізуючі властивості і він мав високу специфічну активність. Сукупність перелічених ознак дає можливість використовувати аулергін в практичній ветеринарній медицині при оздоровленні неблагополучних на хворобу Ауескі господарств.

Використання способу одержання аулергіну в практичній ветеринарній медицині є необхідним для прижиттєвого виявлення свиней вірусоносіїв при хворобі Ауескі.

