



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52744** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ В РЕАКЦІЇ ІМУНОДИФУЗІЇ (РІД)**

1

2

(21) u201001799

(22) 19.02.2010

(24) 10.09.2010

(46) 10.09.2010, Бюл.№ 17, 2010 р.

(72) СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, КОРОВІН ІГОР ВІКТОРОВИЧ, СТЕГНІЙ МАРИНА ЮРІЇВНА, ФІСЕНКО СВІТЛАНА АНАТОЛІЇВНА, ГОРБАТЕНКО СТАНІСЛАВ КІНДРАТОВИЧ, ДУНАЄВ ЮРІЙ КОСТЯНТИНОВИЧ, БАБАНІН МИКОЛА ІГОРОВИЧ  
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб одержання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) в реакції імунодифузії (РІД), що включає культивування перещеплюваних клітин на суміші ростових середовищ, які містять сироватку ВРХ, освітлення культуральної рідини, осадження антигену, який **відрізняється** тим, що використовують вільну від  $\gamma$ -глобулінів сироватку крові ВРХ, культуральну рідину концентрують ультрафільтрацією на колонках з порожнистими волокнами, сконцентровану культуральну рідину освітлюють центрифугуванням.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології і біотехнології, а саме до способу одержання антигену вірусу лейкозу ВРХ для серологічної діагностики хвороби і може бути використана у промисловому виробництві діагностичних препаратів для визначення антитіл до вірусу лейкозу ВРХ в реакції імунодифузії РІД.

Існує спосіб одержання антигену вірусу лейкозу ВРХ із вірусу вмішуючої культури - лінії клітин нирки ембріона вівці, що хронічно інфікована вірусом лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) для серологічної діагностики в реакції імунодифузії в агаровому гелі із специфічною контрольною системою на вірус лейкозу ВРХ (Михалёв Е.А, Завальный М.А. Оптимизация продукции антигена вируса лейкоза КРС в перевиваемой культуре клеток. Докл. ВАСХНИЛ 1986, 8, с. 29-31). Але вказаний спосіб є складним та має багаторазове центрифугування і ресуспендування. За цією технологією використовують суспензію експлантатів ембріонів корів, що є дорогою сировиною для одержання антигену. Ембріони повинні бути завжди свіжими та взяті від абсолютно здорового стада корів, що робить не можливим освоєння технології у промисловості.

Відомо спосіб одержання антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби (патент RU №2020960, кл. А 61 R 39/12, 15.07.1992). У цьому способі використовують кров коней, оленів, та велику кількість вітамінно-солевих добавок, що робить цей спосіб трудомістким.

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, що заявляється є (Спосіб одержання антигену для діагностики лейкозу ВРХ в реакції імунодифузії А.С. №1585951, кл. А61K 39/12 от 27.12.1988г.).

За цим способом проводять культивування перещеплюваних клітин на поживному середовищі, яке містить середовище ігла, гемогідролізат, сироватку крові ВРХ, антибіотики. Антиген осаджують з культуральної рідини, яку освітлюють центрифугуванням при 10000-12000g. Клітинний детрит після освітлення культуральної рідини піддають ультразвукової дезінтеграції у присутності Твін-80.

Це рішення є найближчим аналогом. Але виділення антигену у цьому способі досягається багаторазовим ресуспензуванням та центрифугуванням. Антиген одержують з низькою активністю і специфічністю.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД), що включає культивування перещеплюваних клітин на суміші ростових середовищ, які містять сироватку ВРХ, освітлення культуральної рідини, осадження антигену шляхом використання вільної від  $\gamma$ -глобулінів сироватки крові ВРХ, концентрування культуральної рідини методом ультрафільтрації на колонках з порожнистими волокнами, освітлення зконцентрованої культуральної рідини центрифугуванням, щоб забезпечити ефективність способу.

(13) **U**  
(11) **52744**  
(19) **UA**

Порівняльний аналіз з найближчим аналогом дозволяє зробити висновок, що використання  $\gamma$ -глобулінової сироватки дозволяє отримати високоактивний і специфічний антиген, ультрафільтрація на колонках з подими волокнами дозволяє уникнути втрат антигену, освітлення зконцентрованої культуральної рідини центрифугуванням дає змогу уникнути великої втрати вірусів, контроль контамінації сторонніми вірусами за допомогою ПЛР дозволяє виявляти контамінанти вірусної етіології, які не викликають цитопатогенну дію в культурах клітин, дозволяє багаторазово підвищити специфічність антигену.

Спосіб виконують таким чином.

Пересів культури клітин FLK-BLV здійснюють один раз на 7-10 діб з посівною концентрацією 50-100 тис. клітин/см<sup>3</sup>. В якості ростового середовища використовують середовища 199, Ігла і сироватку ВРХ, очищену від імуноглобулінів. Характер росту і формування моношару клітин та їх якість визначають шляхом перегляду культури під світловим мікроскопом.

Контроль стерильності культури клітин FLK-BLV та антигену вірусу лейкозу ВРХ здійснюють на тіогліколевому середовищі (ТГС) та контроль контамінації за допомогою ПЛР.

Глікопротеїдний антиген ВЛ ВРХ отримують з вірус - культуральної рідини після її 2-3 разового заморожування-відтавання. Вірус-культуральну рідину спочатку концентрують у 50 - 100 разів на ультрафільтраційній установці з порожнистими волокнами з порогом затримання 10-200 кД. Потім концентрат освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв. впродовж 30 хв. Після цього супернатант збирають, додають до нього 50% розчин ПЕГ-6000 (з розрахунку 200 см<sup>3</sup> розчину на 1 дм<sup>3</sup> концентрату) і витримують 12-24 години за температури 4°C. Після відстоювання антиген осаджують центрифугуванням при 5000 об/хв. впродовж 30 - 40 хвилин. Надосад зливають і утилізують, а осад антигену ВЛ збирають і ресуспендують у рівному об'ємі забуференого фізіологічного розчину. Антиген піддають УЗ-дезінтеграції при 400 Вт, 22 кГц, 100 А впродовж 10 хвилин.

Клітинний детрит, що отримують при освітленні вірус-культуральної рідини збирають, розводять фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1, розмішують до повного розчинення та піддають УЗ-дезінтеграції при 400 Вт, 22 кГц, 100 А впродовж 10 хвилин. Дезінтегрований детрит освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв. впродовж 30 хв. Надосад осаджують 50%-вим розчином ПЕГ-6000 (з розрахунку 200 см<sup>3</sup> розчину на 1 дм концентрату), витримують 12-24 години за температури 4°C. Після відстоювання антиген осаджують центрифугуванням при 5000 об/хв. впродовж 30-40 хвилин. Надосад зливають і утилізують, а осад збирають і ресуспендують у рівному об'ємі забуференого фізіологічного розчину.

Приклад 1.

50 дм<sup>3</sup> вірус-культуральної рідини спочатку концентрували методом ультрафільтрації, а тільки потім очищали від детриту центрифугуванням при 5000 об/хв. У клітинному детриті, який одержували після низькошвидкісного центрифугування попередньо сконцентрованої вірус-культуральної рідини, специфічних білків ВЛ ВРХ в РІД не виявляли. При виготовленні антигену ВЛ для концентрування вірус-культуральної рідини згідно діючої технології використовували ультрафільтрацію на порожніх волокнах з порогом утримання 100 кД. Враховуючи на те, що діагностичну цінність представляють поверхневі білки ВЛ gr 51, gr 30 та внутрішній - р24 з молекулярною масою від 51 до 24 кД, для концентрування вірус-культуральної рідини були випробувані ультрафільтраційні модулі з порожніми волокнами на 15 кД і 50 кД (дослід). Було встановлено, що при отриманні антигену ВЛ за стандартною технологією, його кількість складала (335,0 ± 7,6 см<sup>3</sup>) з 50 дм<sup>3</sup> вірус-культуральної рідини з активністю в РІД 1:1,2 - 1:1,8, в той час дослідного антигену було отримано (450,0 ± 17) см<sup>3</sup> з активністю 1:2,0 - 1:3,0 (табл. 1). В таблиці представлені порівняльні дані і оцінки методів отримання антигену вірусу лейкозу ВРХ з культуральної рідини FLK-BLV, яку отримували на середовищі з нативною сироваткою.

Таким чином, використання волокон з меншим порогом утримання дозволило на 34% збільшити вихід антигену ВЛ.

Приклад 2.

50 дм<sup>3</sup> вірус-культуральної рідини накопичували при культивуванні клітин FLK-BLV на середовищі з 10% аглобулінової сироватки крові ВРХ. Було встановлено, що при використанні стандартної технології виготовлення антигену його кількість складала (90,0 ± 5,7) см<sup>3</sup> з 50 дм<sup>3</sup> вірус-культуральної рідини з активністю в РІД 1:3,0 - 1:4,0, в той час при використанні нової технології (дослід) отримали антиген в кількості (155,0 ± 18,9) см<sup>3</sup> з активністю 1:4,0 - 1:5,0 що на 72% більше (табл. 2). В таблиці наведені порівняльні дані оцінки методів отримання антигену вірусу лейкозу ВРХ з культуральної рідини FLK-BLV, яку отримували на середовищі з аглобуліновою сироваткою. За допомогою цього способу вдосконалено технологію одержання антигену ВЛ ВРХ, яка дозволяє у 1,3 - 1,7 рази збільшити його вихід з одиниці об'єму вірус-культуральної рідини, що підвищує ефективність виробництва.

Таким чином спосіб одержання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції Імунодифузії (РІД) є економічним та ефективним, він дозволяє збільшувати вихід антигену ВЛ на 34% - 72. Він придатний для використання в промислових масштабах і дозволяє одержати більшу кількість активного, специфічного та стабільного препарату антигена ВЛВРХ.

Таблиця 1

Спосіб одержання антигену для діагностики  
лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)

Спосіб виготовлення антигену ВЛ	Кількість рідини на концентрацію, дм <sup>3</sup>	Отримано антигену ВЛ, см <sup>3</sup>	Активність АГ в РІД	Кількість детриту, см <sup>3</sup>	Активність детриту в РІД
Згідно з ТУ	50	335,0±7,6	1:1,2 - 1:1,8	240,0±23,1	Нативний
Концентрування вірусмішуючої рідини, центрифугування при 5000об/хв., осадження антигену ВЛ ПЕГ - 6000	50	450,0±17,3	1:2,0 - 1:3,0	90,0±15,2	0

Таблиця 2

Спосіб одержання антигену для діагностики  
лейкозу великої рогатої худоби в реакції імунодифузії (РІД)

Спосіб виготовлення антигену ВЛ	Кількість рідини на концентрацію, дм <sup>3</sup>	Отримано антигену ВЛ, см <sup>3</sup>	Активність АГ в РІД	Кількість детриту, см <sup>3</sup>	Активність детриту в РІД
Згідно з ТУ	50	90,0±5,7	1:3,0 - 1:4,0	240,0±23,1	Нативний
Концентрування вірусмішуючої рідини, центрифугування при 5000об/хв., осадження антигену ВЛ ПЕГ- 6000	50	155,0±18,9	1:4,0 - 1:5,0	90,0±15,2	0