



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 35438

(13) C2

(51) 7 A61K39/42

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОАКТИВНИХ ПРЕЦИПІТУВАЛЬНИХ ПРОТИЛЕЙКОЗНИХ СИРОВАТОК

1

2

(21) 99105607

(22) 14.10.1999

(24) 16.02.2004

(46) 16.02.2004, Бюл. № 2, 2004 р.

(72) Бусол Володимир Олександрович, Шаловалова Ольга Вікторівна, Мяких Ніна Василівна, Зданевич Петро Петрович, Цимбал Віра Іларіонівна, Тертишник Олександр Валентинович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(56) SU A1 1671312, 23.08.1991.

SU A1 1681859, 07.10.1991.

SU 741883, 05.07.1980.

(57) Спосіб одержання високоактивних преципітувальних протилейкозних сироваток, який включає

введення тваринам-продуцентам крові від хворих на лейкоз тварин (інфікування вірусомісними лімфоцитами), відбір крові та відокремлення цільового продукту, який відрізняється тим, що як тварин-продуцентів використовують бичків, яких попередньо імунізують тричі, з інтервалом 14 діб та реімунізують дворазово, з інтервалом 14 діб через 4 місяці після останньої імунізації інактивованими специфічними імуногенними препаратами, та через не менш ніж 14 діб після проведення циклу реімунізації, вводять підшкірно 1 см³ розведеної фізіологічним розчином крові, хворої на лейкоз великої рогатої худоби, з концентрацією 1500 лейкоцитів.

Винахід відноситься до ветеринарної імунології, зокрема, до способів одержання імунних сироваток з високим вмістом протилейкозних антитіл, і може бути використаний на підприємствах ветеринарної промисловості для отримання високоспецифічних позитивних сироваток, які входять до складу лейкозних діагностиків. Використання даного винаходу дозволить підвищити ефективність діагностики лейкозу великої рогатої худоби - хронічного злоскісного захворювання сільськогосподарських тварин.

Відомі способи одержання преципітуючої сироватки проти збудника правця (ACN741883, A61K39/08. Спосіб получения противостолбнячной преципитирующей сыворотки / В.К. Голшмид, Д.А. Закгейм), спосіб отримання імунної сироватки до вірусу грипу (ACN1681859, A61K39/42. Спосіб получения иммунных сывороток к вирусу гриппа / В.Ф. Семенов, О.Н. Агеева, И.В. Головлева), ціль яких досягається одержанням сироватки шляхом використання різних схем імунізації продуцентів інактивованими збудниками захворювання чи їх компонентами, з застосуванням масляного ад'юванту, або очистки цільового продукту іонгами. Але, в запропонованих способах при отриманні активних сироваток, як тварин - продуцентів, рекомендовано використовувати кролів або мишей, що не дає змогу одержувати велику кількість

цільового продукту, а також використання масляного ад'юванту може привести до місцевих реакцій запалення у тварин - донорів сироватки.

Найбільш близьким до винаходу що запропонований, є спосіб одержання протилейкозної сироватки крові (AC 1671312, A61K39/42. Спосіб получения противолейкозной сыворотки крови / Р.С. Москалик). В даному способі для одержання протилейкозної сироватки, вміщуючої високий титр антитіл, використовують баранів, яких заражають інтратестикулярно кров'ю від хворої на лейкоз корови з $2,5 \cdot 10^6$ лімфоцитів в 1 мл нативної крові. Через 30 днів після введення інфекційного матеріалу, а потім через кожні 2-5 місяців виділяють сироватку крові та досліджують її в реакції імунодифузії на наявність специфічних антитіл проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Згідно поданих матеріалів, через 1 місяць титр антитіл в сироватці тварин - продуцентів підвищується до 1:2 - 1:8, через 12 місяців досягає 1:128 - 1:256. Недоліками даного способу є використання баранів, від яких одноразово можна отримати лише 200-300 мл специфічної сироватки, довготривалість експерименту та необхідність утримання тварин у ізоляторі, тому що робота проводиться з інфекційним матеріалом на здорових сприйнятливих тваринах, які можуть стати джерелом збудника інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби в

(13) C2

(11) 35438

(19) UA

господарстві.

В основу запропонованого винаходу поставлено задачу одержання протилейкозної сироватки, яка вміщує антитіла у високих титрах, шляхом імунізації продуцентів специфічними інактивованими імунотенними препаратами з послідовним введенням підшкірно 1мл розведеної крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби з концентрацією 1500 лейкоцитів, чим забезпечити отримання великої кількості високоактивної специфічної сироватки крові для діагностичних потреб.

Для цього використовують вільних від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби бичків, яких попередньо тричі, з інтервалом 14 діб, імунізують і дворазово реімунізують через 4 місяці лейкозоспецифічними імунотенними препаратами. Потім тваринам - продуцентам вводять підшкірно 1мл розведеної стерильним фізіологічним розчином крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби з концентрацією 1500 лейкоцитів.

Порівняльний аналіз з прототипом дозволяє зробити висновок про те, що заявлений спосіб відрізняється від відомого використанням бичків - продуцентів, від яких отримують одноразово 3000-4000мл сироватки, проведенням інфікування попередньо щеплених проти лейкозу тварин, застосуванням для зараження значно меншої кількості активного збудника лейкозу, завдяки чому підвищується специфічна активність сироватки і її діагностична цінність, тварини - продуценти залишаються вільними від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби, не являють собою небезпеки для загального поголів'я, не потребують додаткових збитків для ізолюваного утримання тварин, які можуть бути використані в господарстві для інших потреб, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб пояснюється такими прикладами.

Приклад 1. Виготовляють специфічний імунотенний інактивований препарат №1, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ), одержані з вірусемікуючої культуральної рідини перещеплюваної лінії клітин нирки ембріона вівця, хронічно інфікованої ВЛВРХ, презентовані на біологічному сорбенті-імунотенному, виготовленому з клітин організму вільного від лейкозу рогатої худоби. Відбирають здорових бичків віком 8-10 місяців, яких імунізують даним препаратом тричі, з інтервалом 14 діб, підшкірно, в дозі 2мл (група №1). Через 4 місяці проводять дворазову реімунізацію дослідних тварин вищезазначеним препаратом в тих же дозах. Через 14 діб після проведення циклу реімунізації тваринам вводять підшкірно 1500 лейкоцитів від хворої на лейкоз великої рогатої худоби в 1мл розведеної фізіологі-

чним розчином периферичної крові донора. Проводять відбір крові з виділенням сироватки та визначають титри антитіл до глікопротеїдного антигену ВЛВРХ в сироватці крові за даними реакції імунодифузії, яку проводять за загальноприйнятою методикою, через 1 місяць після зараження тварин, потім через кожний місяць.

Приклад 2. Виготовляють специфічний імунотенний інактивований препарат №2, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби, одержані з короткостроково культивованих лейкоцитів периферичної крові хворої на хронічний лімфолейкоз великої рогатої худоби. Дослідних бичків другої групи імунізують за вищевказаною схемою, але роблять ін'єкції обох препаратів №1 та №2 одночасно. При реімунізації використовують лише препарат №1. Зараження тварин проводять, як вказано вище.

Тварин контрольної групи №3 не імунізують. Зараження проводять аналогічно.

Отримані результати свідчать, що у 100% тварин першої групи через 1 місяць після зараження титр антитіл в сироватці підвищується до $1:56 \pm 26,53$ з коливанням від $1:16$ до $1:128$. Через 1,5 місяця цей показник складає $1:80 \pm 27,71$, з коливаннями $1:32$ - $1:128$. На відміну від тварин першої групи, в другій дослідній групі уже через 1 місяць спостерігали 100% серопозитивність з титрами антитіл $1:128 \pm 0,00$ ($1:128$). Через 1,5 місяця титри антитіл у цих тварин зросли до $1:192 \pm 64,0$ з коливанням від $1:128$ до $1:256$. До четвертого місяця після інфікування титри специфічних антитіл у тварин обох дослідних груп суттєво зменшились до $1:8$ - $1:16$, а на 8 місяці спостережень усі піддослідні тварини були серонегативними. За даними вірусологічних досліджень вони були вільними від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Дослідження серологічного статусу тварин контрольної третьої групи, зараження яких проводили без попередньої імунізації, показали, що через 1 місяць титр антитіл складав $1:2,50 \pm 1,50$ (1 - $1:4$), через 1,5 місяця - $1:8,00 \pm 4,00$, з коливанням від $1:4$ до $1:16$. Наймаксимальнішими у тварин контрольної групи були титри антитіл лише $1:12,2 \pm 2,50$, ($1:4$ - $1:16$), через 8 місяців після інфікування.

Таким чином, застосування запропонованого способу одержання високоактивних преципітуючих протилейкозних сироваток дозволяє отримувати велику кількість специфічної сироватки з титрами антитіл $1:128$ - $1:256$. Проведення процесу згідно запропонованого способу не потребує додаткових затрат на ізолюване утримання тварин.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 35438 (13) A

(51) 6 A61K39/08, 39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОАКТИВНИХ ПРЕЦИПІТУЮЧИХ ПРОТИЛЕЙКОЗНИХ СИРОВАТОК

(21) 99105607

(22) 14.10.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Бусол Володимир Олександрович, Шаповалова Ольга Вікторівна, Мяких Ніна Василівна, Зданевич Петро Петрович, Цимбал Віра Іларіонівна, Тертишник Олександр Валентинович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб одержання високоактивних преципітуючих протилейкозних сироваток шляхом імунізації продуцентів специфічними імуногенними препаратами з наступним відбором крові та відокремленням цільового продукту, який відрізняється тим, що після реімунізації тваринам - продуцентам вводять підшкірно 1 мл розведеної крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби з концентрацією 1500 лейкоцитів.

Винахід відноситься до ветеринарної імунології, зокрема, до способів одержання імунних сироваток з високим вмістом протилейкозних антигенів, і може бути використаний на підприємствах ветеринарної промисловості для отримання високоспецифічних позитивних сироваток, які входять до складу лейкозних діагностиків. Використання даного винаходу дозволить підвищити ефективність діагностики лейкозу великої рогатої худоби - хронічного злоякісного захворювання сільськогосподарських тварин.

Відомі способи одержання преципітуючої сироватки проти збудника правця (АСN741883, А 61 К 39/08 Спосіб получения противостолбнячной преципитирующей сыворотки / В. К. Голшмид, Д. А. Закгейм), спосіб отримання імунної сироватки до вірусу грипу (АСN1681859, А 61 К 39/42 Спосіб получения иммунных сывороток к вирусу гриппа / В. Ф. Семенов, О. Н. Агеева, И. В. Головлева), ціль яких досягається одержанням сироватки шляхом використання різних схем імунізації продуцентів інактивованими збудниками захворювання чи їх компонентами, з застосуванням масляного адьюванту, або очистки цільового продукту іонітами. Але, в запропонованих способах при отриманні активних сироваток, як тварин - продуцентів, рекомендовано використовувати кролів або мишей, що не дає змогу одержувати велику кількість цільового продукту, а також використання масляного адьюванту може привести до місцевих реакцій запалення у тварин - донорів сироватки.

Найбільш близьким до винаходу, що запропонований, є спосіб одержання протилейкозної сироватки крові (АС 1671312, А 61 К 39/42. Спосіб

получения противолейкозной сыворотки крови / Р. С. Москалик) В даному способі для одержання протилейкозної сироватки, вміщуючої високий титр антитілу, використовують баранів, яких заражають інтрагастрикулярно кров'ю від хворої на лейкоз корови з $2,5 - 5 \times 10^6$ лімфоцитів в 1 мл нативної крові. Через 30 днів після введення інфекційного матеріалу, а потім через кожні 2-5 місяців виділяють сироватку крові та досліджують її в реакції імунодифузії на наявність специфічних антитіл проти вірусу лейкозу великої рогатої худоби Згідно поданих матеріалів, через 1 місяць титр антитілу в сироватці тварин - продуцентів підвищується до $12 - 18$, через 12 місяців досягає $1.128 - 1.256$. Недоліками даного способу є використання баранів, від яких одноразово можна отримати лише 200 - 300 мл специфічної сироватки, довготривалість експерименту та необхідність утримання тварин у ізоляторі, тому що робота проводиться з інфекційним матеріалом на здорових сприйнятливих тваринах, які можуть стати джерелом збудника інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби в господарстві.

В основу запропонованого винаходу поставлено задачу одержання протилейкозної сироватки, яка вміщує антитіла у високих титрах, шляхом імунізації продуцентів специфічними інактивованими імуногенними препаратами з послідовним введенням підшкірно 1 мл розведеної крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби з концентрацією 1500 лейкоцитів, чим забезпечити отримання великої кількості високоактивної специфічної сироватки крові для діагностичних потреб

Для цього використовують вільних від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби бичків,

(19) UA (11) 35438 (13) A

яких попередньо тричі, з інтервалом 14 діб, імунізують і дворазово реімунізують через 4 місяці лейкозоспецифічними імуногенними препаратами. Потім тваринам-продуцентам вводять підшкірно 1 мл розведеної стерильним фізіологічним розчином крові від хворої на лейкоз великої рогатої худоби з концентрацією 1500 лейкоцитів.

Порівняльний аналіз з прототипом дозволяє зробити висновок про те, що заявлений спосіб відрізняється від відомого використанням бичків-продуцентів, від яких отримують одноразово 3000 - 4000 мл сироватки, проведенням інфікування попередньо щеплених проти лейкозу тварин, застосуванням для зараження значно меншої кількості активного збудника лейкозу, завдяки чому підвищується специфічна активність сироватки і її діагностична цінність, тварини-продуценти залишаються вільними від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби, не являють собою небезпеки для загального поголів'я, не потребують додаткових збитків для ізолюваного утримання тварин, які можуть бути використані в господарстві для інших потреб, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб пояснюється такими прикладами.

Приклад 1. Виготовляють специфічний імуногенний інактивованний препарат №1, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ), одержані з вірусмішучою культуральної рідини перещеплюваної лінії клітин нирки ембріона вісці, хронічно інфікованої ВЛВРХ, презентовані на біологічному сорбенті-імуномодуляторі, виготовленому з клітин організму вільного від лейкозу рогатої худоби. Відбирають здорових бичків віком 8-10 місяців, яких імунізують даним препаратом тричі з інтервалом 14 діб, підшкірно, в дозі 2 мл (група №1). Через 4 місяці проводять дворазову реімунізацію дослідних тварин вищезазначеним препаратом в тих же дозах. Через 14 діб після проведення циклу реімунізації тваринам вводять підшкірно 1500 лейкоцитів від хворої на лейкоз великої рогатої худоби в 1 мл розведеної фізіологічним розчином периферичної крові донора. Проводять вибір крові з виділенням сироватки та визначають титри антитіл до глікопротеїдного антигену ВЛВРХ в сироватці крові за даними реакції імунодифузії, яку проводять за загальноприйнятою методикою, через 1 місяць після

зараження тварин, потім через кожний місяць. Одержані дані подані в таблиці №1. *

Приклад 2. Виготовляють специфічний імуногенний інактивованний препарат №2, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби, одержані з короткостроково культивованих лейкоцитів периферичної крові хворої на хронічний лімфолейкоз великої рогатої худоби. Дослідних бичків другої групи імунізують за вищевказаною схемою, але роблять ін'єкції обох препаратів №1 та №2 одночасно. При реімунізації використовують лише препарат №1. Зараження тварин проводять, як вказано вище.

Тварин контрольної групи №3 не імунізують. Зараження проводять аналогічно.

Отримані результати свідчать, що у 100 % тварин першої групи через 1 місяць після зараження титр антитіл в сироватці підвищується до 1.56 ± 26.53 з коливанням від 1:16 до 1:128. Через 1,5 місяця цей показник складає 1.80 ± 27.71 , з коливаннями 1:32 - 1:128. На відміну від тварин першої групи, в другій дослідній групі уже через 1 місяць спостерігали 100% серопозитивності з титрами антитіл 1.128 ± 0.00 (1:128). Через 1,5 місяця титри антитіл у цих тварин зросли до $1:192 \pm 64.0$ з коливанням від 1:128 до 1:256. До четвертого місяця після інфікування титри специфічних антитіл у тварин обох дослідних груп суттєво зменшились до 1:8 - 1:16, а на 8 місяці спостережень усі піддослідні тварини були серонегативними. За даними вірусологічних досліджень вони були вільними від інфекції вірусу лейкозу великої рогатої худоби. Дослідження серологічного статусу тварин контрольної третьої групи, зараження яких проводили без попередньої імунізації, показали, що через 1 місяць титр антитіл складав $1:2.50 \pm \pm 1.50$ (1 - 14), через 1,5 місяця - $1.8,00 \pm 4.00$, з коливанням від 1:4 до 1:16. Наймаксимальнішими у тварин контрольної групи були титри антитіл лише $1.12,2 \pm 2.50$. (1:4 - 1:16), через 8 місяців після інфікування.

Таким чином, застосування запропонованого способу одержання високоактивних преципітуючих протилейкозних сироваток дозволяє отримувати велику кількість специфічної сироватки з титрами антитіл 1:128 - 1:256. Проведення процесу згідно запропонованого способу не потребує додаткових затрат на ізолюване утримання тварин.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патенти»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 - 72 - 88 (03122) 2 - 57 - 03