



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **84118**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 04663**

(22) Дата подання заявки: **15.04.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.10.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.10.2013, Бюл.№ 19**

(72) Винахідник(и):

**Стегній Борис Тимофійович (UA),
Обуховська Ольга Валеріївна (UA),
Бабкін Анатолій Федорович (UA),
Гончаренко-Прокоф'єва Валентина
Василівна (UA),
Михайлова Світлана Анатоліївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ СПЕЦИФІЧНОГО АНТИВИДОВОГО ОВІСНОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО КОН'ЮГАТУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ ІНФЕКЦІЙНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ДРІБНОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ІМУНОФЕРМЕНТНИМ МЕТОДОМ (ELISA)

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення специфічного антивидового овісного пероксидазного кон'югату для діагностики захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби імуноферментним методом (ELISA) включає осадження імуноглобулінів (Ig) ПЕГом, центрифугування, отримання загальної фракції гаммаглобуліну. Осадження ПЕГом проводять одноразово, центрифугують при 3000 об./хв. протягом 15 хв. та додатково проводять іонообмінну хроматографію з подальшою фільтрацією отриманого розчину Ig, імунізацію гетерогених тварин з виділенням IgG із антисироватки та кон'югацією отриманих IgG за методом Nakane з пероксидазою хрому.

UA 84118 U

Корисна модель належить до ветеринарної імунології, зокрема до виготовлення специфічного антивидового овисного пероксидазного кон'югату для імуноферментних методів при діагностиці захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби.

Відомо, що існує тест-система діагностична імуноферментна для визначення протибруцельозних антитіл у сироватках крові людини або великої рогатої худоби (ВРХ) (патент України на винахід № 48811, МПК А61К 39/21, Тест-система діагностична імуноферментна для визначення протибруцельозних антитіл у сироватках крові людини або великої рогатої худоби (ВРХ), 15.08.2002. Бюлетень № 8), в складі якої як кон'югат використовують антивидові антитіла (анти IgM+IgG людини або анти-ВРХ), мічені ферментом, але компоненти не можуть бути використані для виділення специфічних антитіл у сироватці крові дрібної рогатої худоби при постановці імуноферментного аналізу.

Найбільш близьким до корисної моделі є спосіб виділення імуноглобуліну G із сироватки крові курей (АС № 1695931. Способ выделения иммуноглобулина G из сыворотки крови кур, 07.12.1991. Бюлетень № 45). За цим способом отримують IgG багаторазовим методом, а саме: дворазово осаджують ПЕГом, центрифугують 4 рази, інкубують 3 рази та проводять одноразово діаліз. Недоліком даного способу є те, що він трудомісткий, тривалий у виконанні та передбачає виділення Ig G лише з сироватки курей.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення специфічного антивидового овисного пероксидазного кон'югату для діагностики захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби імуноферментним методом (ELISA), що включає осадження імуноглобулінів (Ig) ПЕГом, центрифугування, отримання загальної фракції гаммаглобуліну, шляхом одноразового осадження ПЕГом, центрифугування при 3000 об./хв. протягом 15 хвилин, та додаткового проведення іонообмінної хроматографії з подальшою фільтрацією отриманого розчину Ig, імунізації гетерогенних тварин, з виділенням Ig G із антисироватки та кон'югації отриманих Ig G за методом Nakane з пероксидазою хрому.

Порівняльний аналіз з прототипом дозволяє зробити висновок, що спосіб, який пропонується, відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

На першому етапі із сироватки крові дрібної рогатої худоби одержують загальну гаммаглобулінову фракцію. Для осадження загальної гаммаглобулінової фракції сироватку крові дрібної рогатої худоби в об'ємі 100,0 см³ доводять до рН 7,2-7,4, використовуючи 10 % розчин соляної кислоти або 1 М бікарбонату натрію. У сироватці з рН 7,2-7,4 розчиняють наважку ПЕГ-115 до кінцевої концентрації 7-8 %. Після розчинення ПЕГ-115 при постійному перемішуванні 10-15 хвилин у вигляді пластівців випадає осад, який являє собою гаммаглобуліни. Осад видаляють шляхом відстоювання протягом 2-10 год. або центрифугування протягом 15 хв. при 3000 об./хв. При цьому температура рідини повинна бути в межах від 5,0 °С до 10,0 °С. Одержаний осад розчиняють у 10,0 см³ фізіологічного розчину (0,85 % натрію хлористого).

Наступний етап - одержання імуноглобуліну G із гаммаглобулінової фракції. Для роботи необхідно:

- ДЕАЕ сефадекс А-50;
- 0,1 М і 0,01 М фосфатний буфер з рН 6,5;
- 0,1 М соляна кислота;
- 0,5 М гідроксид натрію.

Перед використанням заряджають іонообмінник загальновідомим методом. Заряджений іонообмінник урівноважують 0,1 М фосфатним буфером з рН 6,5, потім 0,01 М фосфатним буфером з рН 6,5. До 10,0 см³ розчину гаммаглобуліну додають 20,0 г урівноваженого ДЕАЕ сефадексу А-50. Суміш періодично перемішують протягом 60 хв. за температури 4,0 °С. Потім фільтрують та 4 рази відмивають 0,01 М фосфатним буфером порціями по 50,0 см³. Фільтрат та промивну рідину об'єднують і змішують із 20,0 г ДЕАЕ сефадексу за тими ж самими умовами. Знову фільтрують і відмивають 0,01 М фосфатним буфером. Імуноглобулін класу G міститься у об'єднаному фільтраті.

Для отримання антитіл проти імуноглобуліну G вівці проводять гіперімунізацію кролів за наступною схемою.

Ґрунт-імунізація - вводять підшкірно багатоточковими ін'єкціями по хребту та внутрішньом'язово в ділянці підколінного лімфовузла в об'ємі 2,0 см³, з розрахунку на одну тварину 1,0-2,0 мг імуноглобулінів G вівці в 1,0 см³ фізіологічного розчину, змішаного з однаковим об'ємом "montanite" або масляного ад'юванту Фрейда.

Наступні імунізації проводяться через місяць після ґрунт-імунізації, кожні 24 години внутрішньовенно у краєву вену вуха із зростаючою дозою (0,5; 0,7; 1,0 см³) із вмістом 1,0-2,0 мг імуноглобуліну G вівці в 1,0 см³ фізіологічного розчину.

Після досягнення титру антитіл у сироватці крові не менше 1:16 в РІД кролів знекровлюють, відбираючи стерильно кров. Після ретракції згустку відбирають антисироватку.

Потім з антисироватки виділяють імуноглобулін класу G, за методикою як вказано раніше.

Кон'югацію одержаного імуноглобуліну G з пероксидазою хрому проводять методом періодатного окислення (метод Nakane). Для стабілізації кон'югату додають бичачий сироватковий альбумін (БСА) 1,0 %, мертіюлят 0,02 % або гліцерин 50,0 % і зберігають невеликими порціями за температури - (18,0-20,0) °C.

Приклад 1. Специфічність, активність та чистоту отриманої антисироватки визначали у реакції імунодифузії (РІД) з імунізуючою суспензією Ig G вівці, де визначені титри сироваток 1:16 з наявністю однієї лінії преципітації, що є характерним показником чистоти імунізуючої суспензії по відношенню до примісних білків.

Приклад 2. Визначення активності специфічного антивидового овісного пероксидазного кон'югату проводили шляхом титрації в ІФА з позитивними та нормальними сироватками. Для постановки ІФА були взяті бруцеляовісний імуносорбент, специфічний антивидовий овісний пероксидазний кон'югат, позитивні і нормальні сироватки з "Набору для серологічної діагностики інфекційного епідидиміту баранів в РТЗК" (ТУ У 46.15.247-97), фосфатно-сольовий буфер, твін-20 (ФСБтв), pH-7,2, 0,1 % розчин бичачого сироваткового альбуміну, 0,04 % розчин ортофенілендіаміну, дистильована вода, 8N сірчана кислота.

Постановку непрямого методу ІФА проводили за стандартною методикою з дотриманням контролів: контроль неспецифічної сорбції антигену, контроль субстрату, контроль неспецифічного зв'язування антитіл. Облік результатів реакції проводили спектрофотометрично за довжиною хвилі 492 нм на аналізаторі імуноферментному "Sunrise" (Tecan), програма автоматичного комп'ютерного обліку "Magellan".

Було встановлено, що отриманий специфічний антивидовий овісний пероксидазний кон'югат має робоче розведення 1:400, яке забезпечує виявлення специфічних антитіл у максимальних розведеннях та не приводить до значних збільшень оптичної екстинції ($OE < 0,22$) фонових показників контролів субстрату та неспецифічних зв'язувань, які були на рівні OE негативних сироваток, що свідчить про відсутність неспецифічних фонів при взаємодії кон'югату з компонентами реакцій. Титром кон'югату, вважали його останнє розведення, в якому оптична екстинція позитивної сироватки перевищувала OE негативної сироватки не менше ніж в 2 рази. Дане співвідношення зберігалось при розведенні кон'югату від 1:50 до 1:1200, із помітним зменшенням активності (див. таблицю).

Специфічний антивидовий овісний пероксидазний кон'югат може бути використаний для імуноферментного методу (ELISA) при діагностиці захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби, з обов'язковою попередньою титрацією кон'югату у непрямому методі ІФА з позитивними та нормальними сироватками до відповідного імуносорбенту.

Таким чином, наведені приклади свідчать, що спосіб отримання специфічного антивидового овісного пероксидазного кон'югату методом (ELISA) є менш трудомістким та виконується за коротший час, ніж зазначено у прототипі. Отриманий кон'югат є специфічним та активним у розведенні 1:400 та може використовуватись у постановці ІФА непрямым методом при діагностиці захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби.

Таблиця

Спосіб виготовлення специфічного антивидового овісного пероксидазного кон'югату для діагностики захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби імуноферментним методом (ELISA)

Показники	Розведення кон'югату								Контроль субстратів
	Сироватки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1000	1:1200	
Розведення антигену 1:100	Позит.	0,735	0,792	0,455	0,668	0,322	0,191	0,184	0,052
	Позит.	0,659	0,693	0,316	0,456	0,241	0,265	0,203	0,058
Розведення сироваток 1:100	Негат.	0,311	0,281	0,23	0,298	0,119	0,145	0,151	0,053
	Негат.	0,27	0,289	0,142	0,164	0,08	0,121	0,13	0,047
Контроль неспециф. зв'язування антигену	Сироватки відсутні	0,106	0,095	0,07	0,076	0,069	0,085	0,127	0,053
Розведення антигену 1:200	Позит.	0,6	0,612	0,606	0,761	0,14	0,151	0,122	0,047
	Позит.	0,696	0,628	0,43	0,423	0,184	0,208	0,097	0,048
Розведення сироваток 1:200	Негат.	0,404	0,295	0,166	0,141	0,109	0,155	0,16	0,05
	Негат.	0,447	0,291	0,15	0,179	0,079	0,13	0,084	0,049
Контроль неспециф. зв'язування антигену	Сироватки відсутні	0,107	0,105	0,074	0,083	0,084	0,063	0,11	0,044
Контроль неспециф. зв'язування антитіл	Позит.	0,376	0,326	0,149	0,221	0,082	0,098	0,066	0,046
	Негат.	0,308	0,208	0,062	0,226	0,08	0,094	0,0980	0,048

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб виготовлення специфічного антивидового овісного пероксидазного кон'югату для діагностики захворювань інфекційної етіології у сироватці крові дрібної рогатої худоби імуноферментним методом (ELISA), що включає осадження імуноглобулінів (Ig) ПЕГом, центрифугування, отримання загальної фракції гаммаглобуліну, який **відрізняється** тим, що осадження ПЕГом проводять одноразово, центрифугують при 3000 об./хв. протягом 15 хв. та
- 10 додатково проводять іонообмінну хроматографію з подальшою фільтрацією отриманого розчину Ig, імунізацію гетерогених тварин з виділенням IgG із антисироватки та кон'югацією отриманих IgG за методом Nakane з пероксидазою хрому.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601