

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології (біотехнології), а саме до способів одержання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ) в реакції преципітації.

Лейкоз ВРХ - хронічне інфекційне злоскісне захворювання ВРХ, яке викликається вірусом, належним до род. Retroviridae. Лейкоз спричиняє значні економічні збитки тваринництву та небезпечний для людей.

Метою винаходу є одержання антигену для діагностики лейкозу ВРХ з подальшим використанням його в реакції преципітації.

Існує "Способ получения антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота" (патент России №2020960, кл. А61К39/12 от 15.10.1994). Сутність винаходу в тому, що культивують вірус продукуючих клітин на ростовому середовищі, що містить середовище Ігла, сироватку крові коняки, північних оленів, вітамінно-сольові домішки культивування проводять в апараті типу „Гироген”. Цей спосіб є трудомістким та ще має не вітчизняні компоненти.

В способі одержання антигену (патент России №2152224 G01N33/53 от 30.06.98 "Способ получения антигена") використовується, глибоке заморожування, що має велику собівартість.

Прототипом може бути "Способ получения антигена для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в реакции иммунодиффузии" (Ас., №1585951 кл. А61К39/12, от 27.1988г.). Культивування клітин, що хронічно інфіковані онкорнавірусним антигеном, проводять на живильному середовищі, що містить гідролізат та має 0,5% білка, в яке додатково вводять гемогідролізат, а антиген одержують із твердої фази шляхом ультразвукової дезінтеграції. Таким чином одержують антиген. Цей спосіб може бути прототипом. Але його використовують в РІД (реакція імунодифузії).

В основу винаходу, що передбачається, поставлено задачу розробити спосіб одержання антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби шляхом культивування перещеплюваних ліній клітин на суміші живильних середовищ з сироваткою крові великої рогатої худоби (ВРХ), та з послідовним розділенням твердої фази від рідкої, та додаванням до суміші живильних середовищ: Ігла (45%), 199 (40%), додають L-глутамін (0,05%), аглобулінову сироватку крові ВРХ (15%), інсулін (0,5ЕД/мл), енробіофлор (1:20⁻³), після чого клітинно-культуральна рідина поєднується з надосадом, що отримують додаванням поверхнево-активної речовини до фіксованих на склі FLK+BLV, з подальшим титруванням одержаного антигену в реакції преципітації, щоб забезпечити можливість титрування антигену в реакції преципітації.

Аналіз відомих технічних рішень в галузі вірусології (біотехнології) дозволяє зробити висновок про відсутність ознак, що схожі з суттєвими відмінними ознаками способу, що заявляється, та признати це рішення, відповідним критерію "суттєві ознаки".

Спосіб виконується таким чином.

Антиген вірусу лейкозу виготовляють з клітинно-культуральної рідини перещеплюваної лінії клітин нирки та селезінки теля, що інфіковані бичачим лейкозним вірусом (FLK+BLV).

Клітини вирощують 5-7 днів в рідкому живильному середовищі, що включає середовища: Ігла (45%), 199 (40%), аглобулінову сироватку крові ВРХ (15%), L-глутамін (0,05%), інсулін (0,5ЕД/мл), енробіофлор (1:20⁻³).

Одержану клітино-культуральну рідину асептично зливають в окрему ємність, а до фіксованих на склі FLK+BLV додають 2 об'єми 0,25-0,5% розчину ПАР (Твин-80, Тритонх100, Савинол). Після періодичного струшування через 2-3 години рідину з клітинами, що деструйовані, зливають та освітлюють центрифугуванням при 3-5 тис.об/хв. Надосад поєднують з ККР.

Після чого суміш концентрують x10 на апаратах розділяючих з пропускною здатністю 15 КДТ під тиском 0,2-0,3 атм.

Концентрат освітлюють центрифугуванням при 3-5 тис.об/хв. і до надосаду додають 50%-ний розчин ПЕГ-1000 до 10% концентрації ПЕГ вміщуючий концентрат витримують 18-24 години при температурі 2-8°C, центрифугують при 3-5 тис.об/хв., а осад ресуспендують у 4 об'ємах фосфатно-буферного розчину NaCl, що містить тіомерсал та енробіофлор у концентрації 1:10⁻³ д.р.

До одержаного гомогенату додають 30% 1,1,2-трихлортрифторетану, шутелюють 2-3 години при температурі 2-8°C, центрифугують при G 200-300. З одержаних 3-х фракцій: нижня - 1,1,2-трихлортрифторетан, середня - денатурований баластний білок, верхня - антиген вірусу лейкозу. Верхню фракцію звільнюють від залишків 1,1,2-трихлор трифторетона в повітряній камері під тиском 30-40 Па.

Після чого антиген титрують в реакції преципітації проти позитивної сироватки та доводять його до титру 1:4-1:6 за допомогою фосфатно-буферного розчину NaCl.

Перевірка антигену на стерильність здійснюється за загальноприйнятими методами. Для перевірки вірусного антигену, одержаного з культуральної рідини лінії клітин FLK+BLV на повноту інактивації відбирають 4 серонегативних до вірусу лейкозу телят у віці 8-24 місяці. Інактивованими вважають антигени досліджуваної серії, після ін'єкції яких у телят на протязі 4 місяців не виявлені в реакції імунодифузії специфічна антитіла проти вірусу лейкозу ВРХ.

Використання рідкого живильного середовища що містить: середовище Ігла, середовище 199, аглобулінову сироватку крові ВРХ, L-глутамін, інсулін, енробіофлор та використання надосаду (витяжка з клітинного детриту) дає можливість збільшити вихід антигену в 2-2,2 рази з одиниці сировини.

Спосіб придатний для використання у промисловому виробництві.