

Винахід, що передбачається відноситься до ветеринарної імунології, а саме для отримання високоспецифічних позитивних сироваток, що входять до складу лейкозу наборів для діагностики великої рогатої худоби.

Існує спосіб одержання преципітуючої сироватки до вірусу грипу (Ас. №1681859, А61К39/42), сироватку одержують шляхом імунізації продуцентів інактивованими збудниками захворювання з застосуванням масляного ад'юванту. В запропонованому способі при отриманні активної сироватки, як тварин-продуцентів використовують кролів або мишей, що не дає можливості одержувати велику кількість цільового продукту. Використання масляного ад'юванту може привести до місцевих реакцій захворювання у тварин-донорів сироватки.

Найбільш близьким до запропонованого способу є спосіб одержання протилейкозної сироватки, яка вміщує високий титр антитіл, використовують баранів, яких заражають інтратестикулярно кров'ю від хворої корови (Ас. №167312, А61К39/42 "Способ получения противолейкозной сыворотки крови"). Недоліком способу є використання баранів, від яких отримують 200-300 см³ сироватки та довготривалість експерименту.

В основу винаходу, що передбачається поставлено задачу розробити спосіб одержання позитивної контрольної сироватки до антигену для діагностики лейкозу великої рогатої худоби в реакції преципітації, що включає одержання сироватки від позитивно реагуючих на лейкоз тварин, освітлювання сироватки центрифугуванням на поточній або кутовій центрифугах, або сепарацією на кров'яному сепараторі АСГ-3М, шляхом додавання до сироватки енроксилу або енробіофлосу в концентрації 0,01% (сухої речовини), фільтрацією (крізь фільтр-пластину типу "Ф") з подальшим збільшенням концентрації у 25-50 разів (на апаратах розподільчих на волокнах з щільністю 100КДТ) з послідовним освітлюванням концентрату центрифугуванням, титрацією та розведенням концентрату до титру 1:32-1:64 в реакції дифузійної преципітації проти антигену вірусу лейкозу, щоб забезпечити одержання високоактивної позитивної контрольної сироватки до антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби.

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: у тварин відбирають кров методом тотального знекровлення або перманентної експлуатації при заборі крові по 5л кожні 12-14 днів.

Кров відбирають в широкогорлі, скляні, металеві емалеві або з харчової пластмасової ємності та витримують 1 годину при температурі 37±0,5°С, обводять згустків від стінок та розташовують у холодильнику при 2-8°С на 4-6 годин.

Сироватку відділяють від згустку, звільняють від формених елементів центрифугуванням при G 200-300 додають до неї енробіофлос або енроксил 1:20000 д.р.

Завчасно готують замкнуту систему роздільної фільтрації, що містить скляну ємність, насос перистальтичний, апарат роздільний з волокнами УПВ та з перепускною здібністю 100КДТ, ємність для фільтрату.

Ці дві ємності стерилізують автоклавуванням (1,5атм, 45хв.), а апарат роздільний сумішшю 10% мурашиної кислоти та 50% пергідролу 24 години після його наповнення. Апарат промивають 20-ма об'ємами деіонізованої води.

Для одержання позитивної контрольної сироватки для лейкозного антигену першу ємність заповнюють на 1/2 об'єму сироваткою крові та за допомогою перистальтичного насоса методом циркуляційного подавання під тиском 0,25-0,3атм відфільтровують крізь апарат роздільний розчин аглобулінових фракцій (аглобулінову сироватку) до концентрації рідини до початкового об'єму x10.

Концентрат титрують в реакції преципітації проти лейкозного антигену, розчиняють фільтратом до титру 1:32-1:64 та використовують в якості позитивної контрольної сироватки.

Позитивну контрольну сироватку використовують в рідкому стані або ліофільне висушують.

Приклад 1.

Виготовляють специфічний імуногенний інактивований препарат №1, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби (ВЛВРХ), одержані з вірусмішучої культуральної рідини перещеплюваної лінії клітин нирки ембріона вівці, 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, підшкірне, в дозі 2мл (група №1). Через 4 місяці проводять дворазову реімунізацію дослідних тварин вищезазваним препаратом в тих же дозах. Через 14 діб після проведення циклу реімунізації тваринам вводять підшкірне 1500 лейкоцитів від хворої на лейкоз великої рогатої худоби в 1 мл розведеної фізіологічним 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 імуногенний інактивований препарат №2, який вміщує антигени вірусу лейкозу великої рогатої худоби, одержані з короткострокове 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 однооментно. 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% серопозитивність з титрами антитіл 1:128±0,00 (1:128). Через 1,5 місяця титри антитіл у цих тварин зросли до 1:192±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, дозволяє отримувати високоактивну позитивну контрольну сироватку до антигену вірусу лейкозу ВРХ.