



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14592 (13) A

(51)6 A 61 K 39/225; C 12 N 7/06

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДБез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769 XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ РОТАВІРУСНОГО АНТИГЕНУ З ПОЛЬОВИХ МАТЕРІАЛІВ

1

(21) 94063118
(22) 01.06.94
(24) 20.01.97
(46) 25.04.97, Бюл. № 2
(47) 20.01.97
(72) Міськевич Степан Володимирович, Онуфрієв Владислав Петрович, Скибіцький Володимир Гурійович, Герстман Микола Володимирович, Постой Віктор Петрович
(73) Український державний аграрний університет (UA)

2

(57) Спосіб приготування ротавірусного антигену з польових матеріалів шляхом дворазового послідовного центрифугування суспензії, який відрізняється тим, що суспензію очищають хлороформом концентрують поліетіленгліколем, фільтрують через тканину Петрянова, сорбційний шар якої з осадам розчиняють в хлороформі і додають фізіологічний розчин при струшуванні, відділяючи потім надосад, в якому концентрується вірус, центрифугуванням.

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології і може бути використаний для діагностики ротавірусної інфекції новонароджених телят і поросят.

Відомий спосіб приготування специфічного антигена з фекалій хворих ротавірусним гастроентеритом дітей (Zissls G., Lambert J.P., De Kegel D. Routine diagnosis of human rotavirus in stools. - J. Clin. Pathol., 1978, vol. 31, p. 175-178), який базується на дворазовому послідовному центрифугуванні суспензії фекалій в фосфатно-буферному сольовому розчині при 5 тис. обертів за хвилину на протязі 10 хвилин. Надосад після повторного центрифугування використовується як антиген. Від антикомплементарності звільняються додаванням рідкого об'єму сироватки крові плодів великої рогатої худоби.

Однак існуючий спосіб із-за низької активності та високої антикомплементарності

отриманого антигена не характеризується високою діагностичною ефективністю. Крім того, із-за недостатньої очистки і концентрування в підготовлених таким способом матеріалах дуже важко виявити ротавірус під електронним мікроскопом.

В основу винаходу поставлено задачу забезпечення можливості виявлення в реакції зв'язування комплемента (РЗК) ротавірусного антигена в польових матеріалах від хворих та загинув тварин, а також підвищення ефективності діагностики ротавірусної інфекції в реакції дифузної преципітації (РДП) та методом електронної мікроскопії шляхом підготовки польового матеріалу для дослідження, який включає попередню очистку суспензії фекалій, вмістного кишечника та органів загинув тварин хлороформом, концентрування надосаду поліетіленгліколем (ПЕГ), фільтрування отриманої суспензії через тканину Петрянова.

(19) UA (11) 14592 (13) A

виділення вірусу при розчиненні сорбційного шару тканини в хлороформі з одночасним переводом його у фізіологічний розчин при струшуванні (після додавання 1/10 – 1/100 фізіологічного розчину від початкового об'єму суспензії) та відділення хлороформу від кінцевого продукту – антигена центрифугуванням.

Обробка суспензії дослідного матеріалу хлороформом дає можливість очистити її від баласту та чутливих до дії хлороформу вірусів.

При концентруванні ПЕГ-ом очищеної суспензії відбувається руйнування заряджених сольватних оболонок навколо вірусних частинок. Це дає можливість сорбувати вірус на сорбційному шарі тканини Петрянова. Вона являє собою фільтруючий двошаровий матеріал ФПП-15-1,5, який випускається промисловістю. Нижній шар – марля, верхній – сорбційний матеріал, який розчиняється в хлороформі, але неактивний в біологічних середовищах. Відомо використання цієї тканини в якості фільтра газових середовищ в хімічних виробництвах, для сорбції ентеровірусів із стічної води з подальшим їх елююванням.

Розчинення верхнього шару тканини із сорбованим на ньому вірусом проводиться при поступовому внесенні хлороформу до повного розчинення тканини. Чутливі до дії хлороформу віруси, які могли б вплинути на специфічність виділеного антигена, руйнуються. Ротавірус, як відомо, до хлороформу не чутливий. Тому, після додавання фізіологічного розчину, в останній переходить практично весь ротавірусний антиген. Відділення хлороформу проводять центрифугуванням. Мінімальна кількість фізіологічного розчину, що додається, залежить від зручності відділення хлороформу в процесі центрифугування і складає 0,1–1 см³, тобто дає можливість концентрувати вірус в 10–10³ раз, що забезпечує його високу активність. Отриманий антиген може бути використаний для діагностики в РЗК (після попередньої обробки сироваткою крові плодів великої рогатої худоби в співвідношенні 1:1). Розроблений спосіб значно підвищує вірогідність виявлення вірусу під електронним мікроскопом і в РДП. При використанні такого антигену ротавірусна інфекція у новонароджених тварин надійно, з високою достовірністю діагностується за 1–2 дні, що дає можливість своєчасно проводити профілактику і лікування.

Таким чином, нами вперше в світі використана відома хімічна властивість сорбційного шару тканини Петрянова розчинятись в хлороформі для виділення концентрованого ротавірусу з польових матеріалів.

Спосіб здійснюється наступним чином: з фекалій, вмістимого кишечника та органів загиблих тварин готують 10%-ну суспензію на фізіологічному розчині або розчині Хенкса (рН 7,2–7,4). Для звільнення від грубих частинок суспензію фільтрують через 2–3 шари марлі, двічі по 30 хв центрифугують при 3–5 тис. обертів за хвилину та очищують хлороформом. Після центрифугування та видалення хлороформу до надсаду додають 8% поліетіленгліколя у вигляді порошка (по вазі), струшують 30 хв. та витримують при температурі 4°C на протязі 16–18 год.

Через 16–18 год суспензію, оброблену ПЕГ-м, фільтрують через тканину Петрянова, використовуючи фільтр Зейтца. Розміщують її на дрібнопористу металеву сітку таким чином, що сорбційний шар тканини був зверху, після чого монтують у фільтр Зейтца.

Після закінчення фільтрації-сорбції сорбційний шар тканини Петрянова обережно знімають разом з осадом і розчиняють в хлороформі, поступово додаючи його при струшуванні до зникнення візуально видимих частинок тканини. Додавши фіз.розчин (1/10–1/100 від початкового об'єму суспензії польового матеріалу), проводять струшування 30–40 хв. потім – центрифугування 20–30 хв. при 3–4 тис. обертів за хвилину. У верхньому шарі міститься концентрований в 10–10³ вірус. З метою зниження антикомплементарності антиген обробляють сироваткою крові плодів великої рогатої худоби у співвідношенні 1:1.

Спосіб дозволяє підвищити комплементазв'язуючу і преципітуючу активність отриманого з польового матеріалу антигена до такого рівня, що він може бути використаний в РЗК і РДП з метою серологічної діагностики ротавірусної інфекції новонароджених тварин. Комплементазв'язуюча активність антигена досить висока, титр його 1:64–1:128. З діагностичною імуною сироваткою в РДП утворюється чітка лінія преципітації.

Порівняльне вивчення в РЗК, РДП та методом електронної мікроскопії матеріалів, отриманих від хворих ротавірусною інфекцією телят і поросят, які оброблялись різними способами, показано, що за допомогою запропонованого способу вдалось значно знизити антикомплементарність в антигенах з польових матеріалів при дослідженні їх в РЗК, і таким чином забезпечити можливість використання цього методу для прискореної діагностики ротавірусної інфекції у телят і поросят, а також суттєво підвищити ефективність РДП і електронної мікроскопії для діагностики та вивчення цього захворювання сільськогосподарських тварин (табл. 1, 2, 3).

З матеріалів табл. 1 видно, що підготов-
ка польових матеріалів для дослідження їх в
РЗК по розробленому нами способу дозво-
ляє в 85% проб повністю позбутись анти-
комплементарності, а в решті 15% зниз-
ти її до такого рівня (2 лорз), який не є
перешкодою для виявлення специфічного
антигена, титри якого досягають 5,0-6,0
лорз (табл. 2). В той же час, підготовка поль-
ових матеріалів для дослідження їх в РЗК
згідно відомих методик або зовсім не зни-
жує антикомплементарності, навприк-
лад, після центрифугування, або таке
зниження було частковим, що не дозволяє
ефективно вести прискорену діагностику
ротавірусної інфекції в РЗК.

В табл. 2 показано, що підготовка поль-
ових матеріалів по розробленому нами спо-
собу в 2-3 рази підвищує діагностичну

ефективність РЗК і РДП не лише по кількості
виявлених позитивних проб, але й по титрах
специфічного антигена, крім того, розроб-
лений спосіб приготування ротавірусного
антигена дозволяє підвищити ефективність
електронної мікроскопії при дослідженні
польових матеріалів в 3-6 разів (табл. 3).

Таким чином, розроблений спосіб
приготування ротавірусного антигена з
польових матеріалів значно відрізняється
від запропонованих раніше не лише по тех-
нології виконання, але й високою якістю
отриманого препарату.

Впровадження запропонованого спосо-
бу приготування ротавірусного антигена не
вимагає спеціального складного та дорогого
обладнання. Його використання та подорого
для широкої мережі вірусологічних ла-
бораторій.

20

Таблиця 1
Результати порівняльного вивчення в РЗК антикомплементарності
підготованих різними способами матеріалів, отриманих від хворих
та здорових дітей і поросат при ротавірусній інфекції

Метод підготовки матеріалу	Досліджено проб	К-сть проб з анти- комплементар- ністю	Титри антиком- п-лентарності в лорз
По розробленому способу	21	3	2,0
Центрифугування (прототип)	21	21	6,0-7,0
Очистка хлороформом та концентрування ПЕТ-м	21	12	4,0-6,0

Таблиця 2
Результати виявлення ротавірусного антигена в підготованих різними
способами польових матеріалів, отриманих від хворих
та здорових дітей і поросат при ротавірусній інфекції

Метод підготовки матеріалу	Дослідже- но проб	в РЗК	Титри (лорз)	в РДП	Титри (лорз)
По розробленому способу	21	18	5-6,0	18	4,0
Центрифугування (прототип)	21	0	0	0	0
Очистка хлороформом та концентрування ПЕТ-м	21	9	3-4,0	6	1-2,0

Т а б л и ц я 3

Результати виявлення за допомогою електронної мікроскопії ротавірусу в
підготованих різними способами польових матеріалах, отриманих від
хворих телят і поросят при ротавірусній інфекції

Метод підготовки матеріалу	Досліджено проб	Виявлено ротавірус
По розробленому способу	21	19
Центрифугування (прототип)	21	3
Очистка хлороформом та концентрування ПЕГ-м	21	6

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Керецман

Замовлення 4139

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101