



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО

(19) UA (11) 14568 (13) A

(51) A 61 K 39/225; C 12 R 1/91

ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 р.Публікується
в редакції заявника

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РОТАВІРУСНОГО АНТИГЕНУ .

1

(21) 94063119
(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, Постой Віктор Петрович
(73) Український державний аграрний університет (UA)
(57) Спосіб отримання ротавірусного антигену шляхом зараження клітин,

2

руйнування їх трьохразовим заморожуванням і розморожуванням та видалення клітинного детриту центрифугуванням з подальшим виділенням вірусу з інфікованих клітин, який відрізняється тим, що із суспензії після обробки й поліетіленгліколем вірус сорбують на тканину Петрянова, сорбційний шар якої з осадом розчиняють в хлороформі і додають фізіологічний розчин при струшуванні, відділяючи потім надосад в якому концентрується вірус, центрифугуванням.

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

Відомий спосіб отримання антигена для діагностики ротавірусного гастроентериту новонароджених дітей (Шекоян Л.А., Дроздов С.Г. Спосіб отримання антигена для діагностики вірусного гастроентериту. Авт. св. СРСР, кл. А 61 В 10/00, № 789115, 1980). Його суть полягає у відділенні інфікованої ротавірусом "SA11" культури клітин нирок зеленої мавпи або клітин Vero від поживного середовища центрифугуванням та виділенні вірусу шляхом додавання до отриманого осаду води в кількості 1/20-1/25 до об'єму осаду. Однак, автори даного способу пропонують використовувати отриманий антиген лише в реакції затримки гемаглютинації.

Для здійснення іншого способу, в основі якого лежить седиментація інфікованих ротавірусом діареї телят Небраски клітин первинно-трипсинізованої культури нирок теляти за допомогою центрифугування на холододвій центрифугу при подальшій обробці осаду ультрацентрифугуванням (P. Otto, U. Müller, H. Günther, W. Schonherr. Herstellung von Rotavirus-Antigen zum Nachweis komplementblinder Antikörper Deutsche Gesundheitswesen, 1979, 34, 41), необхідне складне та дороге обладнання (холодові та ультрацентрифуги), яким в даний час не забезпечені практичні лабораторії. Крім того, отриманий антиген рекомендується використовувати для обмежених досліджень: отримання антисироватки від кроля і теляти та постановки реакції зв'язування комплекта (РЗК).

(19) UA (11) 14568 (13) A

В основу винаходу поставлено задачу підвищення ефективності ротавірусного антигена та розширення сфери його примінення при діагностиці, а також використання для отримання діагностичних імунних сироваток шляхом отримання ротавірусного антигена, який включає попереднє концентрування культуральної рідини поліетіленгліколем (ПЕГ) після звільнення її від клітинного детриту шляхом центрифугування. Фільтрування отриманої суспензії через тканину Петрянова, виділення вірусу при розчиненні сорбційного шару тканини в хлороформі з одночасним його переведенням у фізіологічний розчин при струшуванні (після додавання 1/10 - 1/100 об'ємних частин фізіологічного розчину на 1 частину початкового об'єму культуральної рідини) та відділенні хлороформу від кінцевого продукту - антигена центрифугуванням.

При обробці культуральної рідини ПЕГ-м заряджені сольватні оболонки навколо вірусних частин руйнуються. Це дає можливість сорбувати вірус на сорбційному шарі тканини Петрянова. Вона являє собою фільтруючий двошаровий матеріал ФПТ-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, що веде до значного розведення отриманої суспензії.

Розчинення верхнього шару тканини із сорбованим на ньому вірусом проводиться при поступовому внесенні хлороформу і струшуванні. 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 проводиться 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 універсальний, оскільки може використовуватись для діагностики в РЗК, РДП, електронноскопічних досліджень, для імунізації лабораторних тварин при отриманні діагностичних сироваток. При використанні цього антигена ротавіруса інфекція у новонароджених телят і поросят надійно, з висо-

кою достовірністю діагностується за 1-2 дні, що дозволяє своєчасно проводити профілактику і лікування.

Таким чином, нами вперше в світі використана відома хімічна властивість сорбційного шару тканини Петрянова розчинятись в хлороформі для отримання концентрованого вірусу, зокрема ротавірусного антигена.

Спосіб здійснюється слідуєчим чином. Клітини перевивної лінії СПЕВ заражають ротавірусом "SA₁₁". Після прояву цитопатичної дії вірусу в 70-100% клітин моношару (як правило, через 24-48 год) вірусомістиму культуральну рідину піддають термолізу (тричі заморожують і розморожують), клітинний детрит видаляють після центрифугування при 3-4 тис. обертів за хвилину на протязі 20-30 хвилин. До надосаду додають 8% поліетіленгліколю у вигляді порошку (по вазі) або 20% (по об'єму) 50%-ного розчину ПЕГ-я, струшують 20-30 хв і витримують при температурі +4°C на протязі 16-18 год.

Через 16-18 год суспензію, оброблену ПЕГ-м, фільтрують через тканину Петрянова, використовуючи для цього фільтр Зейтца. Розмішують її на дрібнопористу металеву сітку таким чином, щоб сорбційний шар тканини був зверху, після чого монтуєть у фільтр Зейтца.

Після закінчення фільтрації-сорбції сорбційний шар тканини Петрянова обережно знімають разом з осадом і розчиняють в хлороформі, поступово добавляючи його при струшуванні до зникнення візуально видимих частин тканини. Додавши фіз. розчин (1/10-1/100 від початкового об'єму культуральної рідини), суспензію струшують 30-40 хв., потім центрифугують 20-30 хв при 3-4 тис. обертів на хвилину. У верхньому шарі міститься концентрований в 10-10³ раз вірус.

Препарат, отриманий згідно розробленого нами способу, по своїх діагностичних властивостях як антиген в серологічних реакціях, а також як імуноген при виготовленні імунних сироваток значно переважає антигени, отримані відомими способами (табл. 1).

Випробування антигенів, отриманих різними способами, для виявлення антитіл в сироватках крові тварин-реконвалесцентів, показало, що лише препарат, виготовлений розробленим нами способом, дозволяє ефективно здійснювати ретроспективну діагностику (табл. 2).

Імунізація отриманим антигеном лабораторних тварин (морських свинок і кролів) дала можливість систематично виготовляти високоактивні діагностичні сироватки з титрами 1 : 256 - 1 : 512, які з позитивними

результатами випробувані у виробничих умовах при діагностиці ротавірусної інфекції новонароджених телят і поросят.

У підготовлених згідно розробленому способу матеріалах методом електронної мікроскопії вдалось виявити вірусні частини, які за розміром та формою відповідають ротавірусу.

Таким чином, розроблений спосіб отримання ротавірусного антигена значно відрізняється від запропонованих раніше не лише по технології виконання, але й високою якістю отриманого препарату.

Впровадження запропонованого способу отримання ротавірусного антигена не вимагає спеціального складного та дорогого обладнання. Його використання доступне для широкої мережі вірусологічних лабораторій та біопідприємств, де виготовляються діагностикуми.

При зберіганні в замороженому стані (-10-25°C) на протязі 2 років (строк спостереження) комплементзв'язуюча і преципітуюча активність препарату зберігається без зниження титру, що свідчить про надійність способу.

Т а б л и ц я 1

Результати вивчення серологічної активності антигенів, отриманих різними способами

Спосіб отримання ротавірусного антигена з культуральної рідини	Серологічна активність антигенів	
	РЗК	РДП
По розробленому способу	1:64-1:128	1:4-1:8
Шляхом обробки суспензії поліетіленгліколем	1:8-1:16	в нерозведеному стані 1:2
Шляхом обробки хлороформом та центрифугуванням	1:2-1:4	не активний
По авт. свід. СРСР №789115, 1980	1:4-1:8	не активний
Заморожування-розморожування, триразове	нерозведений	не активний

Т а б л и ц я 2

Результати вивчення в РЗК і РДП сироваток крові порежворілих ротавірусною інфекцією телят з використанням антигенів, отриманих з культурального вірусу різними способами

Спосіб отримання антигена	Досліджено сироваток, в т.ч.	
	в РЗК	в РДП
По розробленому способу	30 28	30* 20
Шляхом обробки суспензії поліетіленгліколем	30 16	30 12
Шляхом обробки хлороформом та центрифугуванням	30 10	30 5
По авт. свід. СРСР №789115, 1980	30 13	30 7
Заморожування-розморожування, триразове	30 8	30 3

* – в чисельнику – досліджено проб, в знаменнику – з них реагувало позитивно.

14568

Упорядник	Техред М.Моргентал	Коректор А. Обручар
-----------	--------------------	---------------------

Замовлення 4137

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

Підписне

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