



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **102595**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 39/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 04006**

(22) Дата подання заявки: **27.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.11.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.11.2015, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):

**Селіщева Надія Василівна (UA),
Андрієнко Юлія Валеріївна (UA),
Богач Микола Володимирович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA)**

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ГЕМОКУЛЬТУР МІКОБАКТЕРІЙ ІЗ КРОВІ, ПОЗИТИВНО РЕАГУЮЧОЇ НА ТУБЕРКУЛІН ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

(57) Реферат:

Спосіб виділення гемокультур мікобактерій із крові позитивно реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби, що включає відбір крові, використання кров'яного середовища як живильного середовища, інкубацію, бактеріоскопію, приготування мазка на предметних скельцях, фарбування за Циль-Нільсеном, причому відбір крові проводять від позитивно реагуючих на туберкулін тварин.

UA 102595 U

Корисна модель є перспективним напрямом науково-дослідних робіт по проблемі туберкульозу і належить до ветеринарної медицини, зокрема до способу виділення та накопичення штамів мікобактерій туберкульозу в умовах лабораторії.

При постановці діагнозу на туберкульоз в господарствах, лабораторні методи діагностики, зокрема бактеріологічний, є основним способом постановки діагнозу. Основними методами прижиттєвої діагностики туберкульозу тварин є алергічні (одноразова внутрішньошкірна туберкулінова проба), а посмертної - патологоанатомічні та бактеріологічні дослідження. Для з'ясування епізоотичної ситуації з туберкульозу в благополучних господарствах діючою інструкцією передбачено застосування допоміжних методів діагностики, а саме: внутрішньовенна туберкулінова проба, симультанна алергічна проба, дворазова внутрішньошкірна проба, офтальмопроба, реакція мононуклеарів крові, імуноферментний аналіз, ККРА (для птиці), ПЛР для детекції ДНК *M. tuberculosis complex*. (Урбан, В.П. К диагностике туберкулеза. //Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза сельскохозяйственных животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионе Сибири. Новосибирск. - 1995. С. 8-9.) Однак, існуючі методи бактеріологічної діагностики із-за їх громіздкості та слабкої чутливості не дозволяють проводити масові дослідження по прижиттєвому виділенню мікобактерій із крові.

Найбільш близьким за технічною суттю до рішення, що заявляється, є спосіб виділення мікобактерій туберкульозу за Методом Прайса. (Кассич, Ю.Я. Туберкулез животных и меры борьбы с ним /Кассич Ю.Я. - Киев. - Урожай. - 199-304 с.)

Метод Прайса використовується для прискореного виділення з патологічного матеріалу мікобактерій туберкульозу і оснований на мікрокультивуванні мікобактерій на предметних скельцях, в глибині рідкого середовища. Як живильне середовище використовується свіжа цитратна гемолізована донорська кров, термін придатності якої для росту мікобактерій - не більше 10 діб. Це рішення може бути прототипом. Хоча цей метод дає змогу виявляти мікроколонії мікобактерій туберкульозу уже через 8-10 днів після посіву, він має ряд суттєвих недоліків: проводяться дослідження патологічного матеріалу від забитих тварин, утруднена кількісна оцінка росту мікобактерій, важко одержати першу генерацію мікобактерій. Окрім цього, в патологічному матеріалі можуть знаходитись атипіві мікобактерії, які також інколи утворюють мікроколонії і тому важко відрізнити від істинних мікобактерій туберкульозу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виділення гемокультур мікобактерій із крові позитивно реагуючої на ППД-туберкулін великої рогатої худоби, що включає відбір крові, використання як живильного середовища кров'яного середовища, інкубацію, бактеріоскопію, приготування мазка на предметних скельцях, фарбування за Циль-Нільсеном шляхом відбору крові від позитивно реагуючих на туберкулін тварин.

Порівняльний аналіз із прототипом дозволяє зробити висновок, що використання у способі крові від позитивно реагуючих на туберкулін тварин дає змогу проводити масові бактеріологічні дослідження та дослідити всіх позитивно реагуючих на туберкулін тварин господарства, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

Напередодні готується стерильний 10 %-ий розчин лимоннокислого натру. У одноразові шприци ємністю 10 см³ (за умов дотримання правил асептики) набирається по 2 см³ приготовленого розчину, голки закриваються обов'язково ковпачками, ставиться нумерація на шприци і розміщуються у штативи. Проби крові відбираються шляхом пункції яремної вени. В день обліку реакцій проводиться стерильний відбір крові від реагуючих на туберкулін тварин підготовленими шприцами до мітки 10 см³. При цьому кров піддається одночасно стабілізації і гемолізу. Шприці з голками закриваються стерильними ковпачками і розміщуються у відповідні гнізда штатива. Проби крові доставляються у лабораторію не пізніше 24 годин. Для посіву крові заздалегідь готуються бактеріологічні пробірки, які розміщуються у штативі, наповнюються дистильованою водою по 10 см³ і стерилізуються в автоклаві (за температури 132 °C протягом 1 години). В лабораторних умовах проби крові пересіваються на підготовлену стерильно дистильовану воду (з розрахунку 1 проба на 4 пробірки дистильованої води). Знімається із шприца голка і кров видавлюється по 2,5 см³ у кожен пробірку. Необхідно кожен пробірку старанно струсити до гомогенної маси щоб кров не утворювала осад. На одержаному при цьому кров'яному середовищі інкубуються присутні в ньому мікроорганізми за температури 37 °C-38 °C протягом 3-6 тижнів, після 14 діб інкубації ріст культури періодично (кожні 7 днів) контролюється бактеріоскопією осаду і пересівом його на елективні живильні середовища і подальшою інкубацією посівів в термостаті за температури 37 °C-38 °C.

Спосіб був попередньо випробуваний в умовах експерименту на 64 морських свинках, 25 з яких були заражені культурою *M. avium*, 10 - *M. intracellulare*, 15 - *M. bovis*, 4 - *M. tuberculosis*.

Найбільший відсоток висіваєності з крові (93 %) відмічався у морських свинок, які були інфіковані мікобактеріями комплексу *avium-intracellulare*.

Приклад 1.

В експерименті на 20 телятах вивчалася динаміка мікобактеріємії після зараження їх культурами *M.avium* та *M.intracellulare*. Мікобактерії з крові експериментально заражених телят вдалось виділити уже через 2 години після підшкірного зараження, тривалість бактеремії досягала 8 місяців. Це свідчить про можливість тривалого персистування атипичних мікобактерій у крові великої рогатої худоби. Алергічні реакції у телят, заражених мікобактеріями пташиного виду та атипичними з'являлися на 27 день і були більш виражені на специфічні (КАМ) і родинні (туберкулін для птиці) алергени чим на параспецифічні (ППД-туберкулін для ссавців). В подальшому ці реакції згладжувалися. Зберігалися вони понад 7,5 місяців (строк спостереження).

Приклад 2.

З метою вивчення природи туберкулінових реакцій провели епізоотологічне обстеження та комплексне дослідження на туберкульоз ВРХ в двох господарствах Одеської області, благополучних щодо туберкульозу, де постійно виявляються реагуючі на туберкулін тварини, яких здають на забій, згідно з діючою інструкцією.

За результатами симультанної алергічної проби реакції у ВРХ були достовірно більш вираженими на КАМ, що вказує на неспецифічну природу туберкулінових реакцій (таблиця 1.1).

Як видно з таблиці 1.1 при патологоанатомічному дослідженні туш і органів забитих з діагностичною метою тварин, характерних для туберкульозу уражень не виявили, а при бактеріологічному дослідженні біоматеріалу не вдалось виділити збудника туберкульозу. З біоматеріалу однієї тварини, яка належить ЕБ "Дачна" виділили культуру III групи за класифікацією Раніона. Від цієї ж тварини раніше виділили ідентичну гемокультуру мікобактерій. Із 63 зразків крові від реагуючих на алергени тварин цього ж господарства при бактеріологічному дослідженні (за розробленою методикою) виділили 6 (9,5 %) гемокультур атипичних мікобактерій, з яких 2 культури віднесли до III групи, а 4 - до IV групи за класифікацією Раніона. Проведеними дослідженнями підтверджено фон сенсibilізації тварин ЕБ "Дачна" атипичними мікобактеріями. Приклад 3.

Провели вивчення динаміки мікобактеріємії у тварин, сенсibilізація яких обумовлена атипичними мікобактеріями (Таблиця 1.2).

З матеріалів таблиці 1.2 видно, що після проведення алергічних досліджень з введенням лише ППД-туберкуліну для ссавців збільшилась вірогідність виділення з крові культур мікобактерій від реагуючих та не реагуючих тварин. Динаміка мікобактеріємії у великої рогатої худоби, яка належить ЕБ "Дачна" Одеської області спостерігалась протягом 24 місяців (строк спостереження). При цьому алергічні реакції на введення алергенів відсутні.

Ізоляція атипичних мікобактерій із крові реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби протягом тривалого часу свідчить про постійну циркуляцію їх у тому чи іншому гурті та персистенцію в організмі.

Приклад 4.

Також було проведено вивчення динаміки мікобактеріємії на морських свинках. В дослід взяли 21 гол. морських свинок, яким вводили завись 8 штамів гемокультур атипичних мікобактерій, виділених з крові великої рогатої худоби (Таблиця 1.3).

Як видно з матеріалів таблиці 1.3 динаміка мікобактеріємії у морських свинок розпочалась на 30 добу після введення завись культур (початок спостереження) від 3-х штамів, а на 60 добу - 5-ти інших штамів, з них у 3-х морських свинок (3-х штамів) культуру з крові виділяли повторно, на 90 добу мікобактеріємія спостерігалась у 2-х штамів, яка повторилась з попереднім виділенням на 60 добу. На 120 добу виділення мікобактерій із крові продовжувалось (штам 8/11 - мікобактерії виділяли починаючи з 60 доби після зараження морських свинок протягом 90 діб, штам 22/12 виділення мікобактерій тривало протягом 120 діб, штам 63/12 та 13/12 виділення мікобактерій розпочалось на 120 добу). Слід зазначити, що за період 120 діб всі морські свинки реагували на ППД-туберкулін для ссавців. Деякі тварини передчасно вийшли з дослід, при бактеріологічному дослідженні матеріалу від них були виділені вихідні культури (9/11, 15/12, 32/12).

Оцінюючи результати проведених досліджень можна зробити висновок, що в організмі великої рогатої худоби та морських свинок атипичні мікобактерії викликають доброякісну специфічну клітинну реакцію і не призводять до прогресування процесу. При цьому розвивається бактеріємія та імунологічні реакції у сенсibilізованих до туберкуліну тварин.

Таким чином, спосіб виділення гемокультур з крові позитивно реагуючих на туберкулін тварин - як спосіб прижиттєвої бактеріологічної діагностики простий з техніки виконання і дозволяє дослідити всіх позитивно реагуючих на туберкулін тварин господарства.

Таблиця 1.1

Спосіб виділення гемокультур мікобактерій із крові
позитивно реагуючої на ППД- туберкулін великої рогатої худоби

Господарство	Середньорічне поголів'я ВРХ гол./корови	Досліджено всього гол./корови	Виявлено реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців		Сезонність, %	Діагностичний забій, гол.	Виділено культур мікобактерій	Досліджено пробкрові	Виділено гемокультур мікобактерій
			гол/корови	%					
СВК "Родіна"	2998 600	5521 1400	4 4	0,11	Червень, 50	2	-	-	-
ЕБ "Дачна"	586 250	507 256	-		Червень, 62,5	2	1	63	6

5

Таблиця 1.2

Спосіб виділення гемокультур мікобактерій із крові
позитивно реагуючої на ППД- туберкулін великої рогатої худоби

№ з/п	Інвентарний номер тварин	30.03.11р. Результати симуль-тальної алергічної проби (потовщення шкіри, мм)		Виділена культура (номер)	15.03.12 р. Результати симуль-тальної алергічної проби (потовщення шкіри, мм),		Виділена культура (номер)	23.06.12 р. Результати симуль-тальної алергічної проби (потовщення шкіри, мм)		Виділена культура (номер)	23.02.13 р. Резуль-тати алергі-чних дослі-джень ППД – тубер-кулін (потов-щення шкіри, мм)	Виді-лена куль-тура (номер)	25.06.13 р. Резуль-тати алергі-чних дослі-джень ППД – тубер-кулін (пото-вще-ння шкіри, мм)	Виді-лена куль-тура (номер)
		ППД – тубе-ркулін	ААМ		ППД – тубе-ркулін	ААМ		ППД – тубе-ркулін	ААМ					
1	1972	4	4	8/11	-	-	-	-	-	-	-	1/13	-	1 1/13
2	1963	5	5	9/11	-	-	-	-	-	-	-		X	X
3	1953	4	4	15/11	-	-	13/12	-	-		-			10/13
4	1933	5	7	22/11	-	-	21/12	-	-		-		-	12/13
5	1919	-	-	-	2	4	-	2	6	38/12	-		2	15/13
6	370	-	-	-	-		-	3	3	51/12	-		X	X
7	376	2	5	36/11	-	-	-	2	-	64/12	-	3/13	-	14/13

Примітка: x - дослідження не проводились

Таблиця 1.3

Динаміка мікобактеріємії у гемокультурах атипівих мікобактерій морських свинок с, заражених

Штами гемокультур	Ізоляція гемокультур від морських свинок після зараження культурами мікобактерій (доба)			
	30	60	90	120
8/11	-	+	+	+
9/11	-	+	+	X
15/11	+	+	-	X
22/12	+	+	-	+
63/12	-	-	-	+
13/12	-	-	-	+
21/12	-	-	-	-
32/12	-	+	-	X

Примітки: 1. "+" - виділена культура мікобактерій

2. "-" - відсутнє виділення культури мікобактерій

3. "х" - морська свинка вибула з досліду

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб виділення гемокультур мікобактерій із крові позитивно реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби, що включає відбір крові, використання кров'яного середовища як живильного середовища, інкубацію, бактеріоскопію, приготування мазка на предметних скельцях, фарбування за Циль-Нільсеном, який **відрізняється** тим, що відбір крові проводять від позитивно реагуючих на туберкулін тварин.

10

Комп'ютерна верстка О. Рябо

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

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