



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14392 (13) U
(51) МПК
A61K 39/018 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БАБЕЗІОЗУ СОБАК

1

(21) u200510818

(22) 15.11.2005

(24) 15.05.2006

(46) 15.05.2006, Бюл. № 5, 2006 р.

(72) Семенко Олена Валентинівна, Прус Михайло Петрович, Галат Владислав Федорович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, що включає зараження собак-донорів 3-4-місячного віку кров'ю від спонтанно хворої на бабезіоз собаки в дозі 2мл, тотальне знекровлення тварин в період максимальної паразитемії, використання як стабілізатора лимоннокислого натрію з розрахунку 50мл 20%-го розчину на 2 літри крові, відокремлення плазми центрифугуванням при 6000об/хв. протягом 60хв, відмивання еритроцитів від плазми фізіологічним розчином при 6000об/хв. протягом 60хв - триразове, лізування осаду еритроцитів у морозильній камері 12 годин з наступним поступовим розморожуванням при кімнатній температурі, відмивання лізату еритроцитів шляхом змішування з десятьма об'ємами фізіологічного розчину і центрифугування протягом 60хв при 6000об/хв три рази до просвітлення надосадової рідини, перенесення у флакон з бусами світлого осаду, отриманого після

2

лізису еритроцитів, розведення його 1:1 фізіологічним розчином, консервування тіомерсалом 1:10000 і гомогенізування в шуттель-апараті або вручну протягом години, який **відрізняється** тим, що цуценят-донорів 4-5-місячного віку без попереднього проведення спленектомії заражають підшкірним введенням 0,5мл крові від спонтанно хворої на бабезіоз собаки, знекровлюють їх в період максимальної паразитемії (яка має бути не меншою 10%), використовують як антикоагулянт та консервант крові розчин Глюгіциру з розрахунку 1:4 для подовження терміну обробки крові на 1-2 доби, відокремлюють плазму шляхом центрифугування при 3000об/хв. 15хв., відмивають еритроцити в фізіологічному розчині при 6000об/хв. протягом 15хв. 2-3 рази, лізують осад еритроцитів сапоніном 1:10000, відмивають лізат еритроцитів з 10-кратним об'ємом фізіологічного розчину шляхом центрифугування 30хв. при 6000об/хв. 2-3 рази до просвітлення надосадової рідини, переносять верхній шар осаду сірого кольору у флакон, гомогенізують отриманий осад вручну у флаконі з бусами протягом години, консервують виготовлений антиген азидом натрію 1:10000 і зберігають в холодильнику при +2-4°C.

Корисна модель відноситься до ветеринарної медицини, зокрема до ветеринарної паразитології.

Відомі способи отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак [Георгиу Х., Растригин А.Е. Изготовление и контроль антигенов из В. canis для РДСК //Ветеринарная патология. -№1. -2003.- С.144-147], що включає в якості донорів собак 3-4-місячного віку, зараження яких проводилось кров'ю від спонтанно хворої на бабезіоз собаки в дозі 2мл; тотальне знекровлення тварин в період максимальної паразитемії; використання в якості стабілізатора лимоннокислого натрію з розрахунку 50мл 20%-го розчину на 2 літри крові; відокремлення плазми центрифугуванням при 6000об/хв. протягом 60хв; відмивання еритроцитів від плазми фізіологічним розчином при 6000об/хв. протягом 60хв. - триразово; лізування осаду еритроцитів у морозильній камері 12 годин з наступним поступовим розморожуванням

при кімнатній температурі; відмивання лізату еритроцитів шляхом змішування з десятьма об'ємами фізіологічного розчину і центрифугування протягом 60хв. при 6000об/хв. три рази до просвітлення надосадової рідини; перенесення у флакон з бусами світлого осаду, отриманого після лізису еритроцитів, розведення його 1:1 фізіологічним розчином, консервування тіомерсалом 1:10000 і гомогенізування в шуттель-апараті або вручну протягом години.

Методика приготування антигена для діагностики бабезіоза собак [Балагула Т.В., Акбаев М.Ш. //Труды Всероссийского института гельминтологии им. К.И. Скрябина. -2001. -Т.37.- С.23-28], що включає попередню спленектомію донорів, внутрішньовенне їх зараження кров'ю від спонтанно хворої на бабезіоз собаки в дозах від 4 до 15мл; знекровлення; відокремлення плазми шляхом центрифугування при режимі 1200об/хв. протягом

(13) U

(11) 14392

(19) UA

10хв; відмивання еритроцитів фосфатно-буферним розчином до просвітлення надосадової рідини і лізування осаду сапоніном; відмивання лізату тричі при режимі 3500об/хв. протягом 10хв. при $t=+4^{\circ}\text{C}$ до просвітлення надосадової рідини; перенесення сірого осаду у флакон та зберігання при $t= -20^{\circ}\text{C}$.

Недоліком вказаних способів є те, що кров після знекровлення собак-донорів необхідно обробляти в день отримання, втрачається активність антигену при лізуванні осаду еритроцитів шляхом заморожування і розморожування та при збереженні при $t= -20^{\circ}\text{C}$, висока вартість консерванта тіомерсалу, що впливає на собівартість антигену та проведення серологічних досліджень.

Корисною моделлю ставиться завдання виготовлення антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак з метою вдосконалення діагностики цього захворювання при хронічному та атиповому перебігу, а також з метою визначення титру антитіл в сироватці крові перехворілих тварин для визначення рівня їх імунітету.

Поставлене корисною моделлю завдання досягається тим, що у способі отримання антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак, що включає, зараження собак-донорів 3-4-місячного віку кров'ю від спонтанно хворої на бабезіоз собаки в дозі 2мл, тотальне знекровлення тварин в період максимальної паразитемії, використання в якості стабілізатора лимоннокислого натрію з розрахунку 50мл 20%-го розчину на 2 літри крові, відокремлення плазми центрифугуванням при 6000об/хв. протягом 60хв, відмивання еритроцитів від плазми фізіологічним розчином при 6000об/хв. протягом 60хв. – триразове, лізування осаду еритроцитів у морозильній камері 12 годин з наступним поступовим розморожуванням при кімнатній температурі, відмивання лізату еритроцитів шляхом змішування з десятьма об'ємами фізіологічного розчину і центрифугування протягом 60хв. при 6000об/хв. три рази до просвітлення надосадової рідини, перенесення у флакон з бусами світлого осаду, отриманого після лізису еритроцитів, розведення його 1:1 фізіологічним розчином, консервування тіомерсалом 1:10000 і гомогенізування в шуттель-апараті або вручну протягом години, згідно корисній моделі цуценят-донорів 4-5-місячного віку без попереднього проведення спленектомії заражають підшкірним введенням 0,5мл крові від спонтанно хворої на бабезіоз собаки, знекровлюють їх в період максимальної паразитемії (яка має бути не меншою 10%), використовують в якості антикоагулянта та консерванта крові розчин Глюгіциру з розрахунку 1:4 для подовження терміну обробки крові на 1-2 доби, відокремлюють плазму шляхом центрифугуванням при 3000об/хв. 15хв., відмивають еритроцити в фізіологічному розчині при 6000об/хв. протягом 15хв. 2-3 рази, лізують

осад еритроцитів сапоніном 1:10000, відмивають лізат еритроцитів з 10-ти кратним об'ємом фізіологічного розчину шляхом центрифугування 30хв. при 6000об/хв. 2-3 рази до просвітлення надосадової рідини, переносять верхній шар осаду сірого кольору у флакон, гомогенізують отриманий осад вручну в флаконі з бусами протягом години, консервують виготовлений антиген азідом натрію 1:10000 і зберігають в холодильнику при $+2-4^{\circ}\text{C}$.

Приклад виготовлення антигену для серологічної діагностики бабезіозу собак. Для отримання крові з максимально високою паразитемією використовуються 4-місячне цуценя живою вагою вкг. Проводиться його дегельмінтизація препаратом Прател з розрахунку 1/2 таблетки одноразово. З метою знищення ектопаразитів використовується інсектоакарицидна пудра «Bolrho».

Після підготовчої роботи проводиться зараження тварини збудником бабезіозу. З цією метою тварині підшкірно вводиться 0,5мл стабілізованої гепарином крові, взятої від спонтанно хворої на бабезіоз собаки. За твариною встановлюється постійний клінічний нагляд з обов'язковою щоденною термометрією та дослідженням мазків крові, взятих з кінчика вуха. Коли паразитемія досягає 25%, проводиться тотальне знекровлення тварини. Кров збирається в стерильні флакони з розчином Глюгіциру з розрахунку 1:4 і обробляється на наступний день. Плазма відокремлюється від формених елементів крові центрифугуванням при 3000об/хв. 15хв.; еритроцити відмиваються в фізіологічному розчині при 6000об/хв. протягом 15хв. триразово; отриманий осад еритроцитів лізується сапоніном, контроль лізису еритроцитів і чистоти матеріалу проводиться шляхом виготовлення мазків та їх дослідження; змішування лізату еритроцитів з 10-ти кратним об'ємом фізіологічного розчину і центрифугування 30хв. при 6000об/хв. 2-3 рази до просвітлення надосадової рідини; робота проводиться з дотриманням стерильності і при постійному контролі пофарбованих препаратів під мікроскопом; зняття верхнього шару осаду (сизуватого кольору, який містить найбільшу кількість паразитів); гомогенізування суміші паразитів вручну в флаконі з бусами протягом години; перевіряння суспензії на чистоту шляхом мікроскопії приготування з неї мазків; флакони з виготовленим антигеном консервують азідом натрію 1:10000, щільно закривають кришками і зберігають в холодильнику при $+2-4^{\circ}\text{C}$. Вихід антигену з 0,5 літрів цільної крові становить 10мл.

Виготовлений запропонованим способом антиген для серологічної діагностики бабезіозу собак може знайти застосування для діагностики бабезіозу в державних лабораторіях ветеринарної медицини, в державних підприємствах ветеринарної медицини, приватних клініках.