



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26855** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/577

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ СПОСІБ ЕКСПЕРТИЗИ М'ЯСА І ПРОДУКТІВ ЗАБОЮ ПТИЦІ НА КОНТАМІНАЦІЮ САЛЬМОНЕЛАМИ**

1

2

(21) u200705637

(22) 22.05.2007

(24) 10.10.2007

(72) СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, UA,  
КРАСНІКОВ ГЕНАДІЙ АНДРІЙОВИЧ, UA,  
ШУТЧЕНКО ПАВЛО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР  
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ  
ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(56)

(57) Імуногістохімічний спосіб експертизи м'яса і  
продуктів забою птиці на контамінацію

сальмонелами, що включає фіксацію шматочків м'язів і печінки у 10 % розчині нейтрального формаліну, заключення їх у парафін, виготовлення гістологічних зрізів, фарбування, який **відрізняється** тим, що проводять інкубацію зрізів з поліклональними кролячими імуноглобулінами G (видовим кон'югатом), обробку зрізів антикролячими імуноглобулінами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому (антивидовим кон'югатом), та візуалізацію діамінобензидином.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме до ветеринарної експертизи продуктів забою птиці, гістології, імуногістохімії. Серед різних харчових продуктів провідне місце в передачі сальмонельозної інфекції належить м'ясу та внутрішнім органам. М'ясо і м'ясні продукти, заражені сальмонелами, як правило, на зовні не змінені, і їх зовнішній вигляд, смак та запах не викликають підозр на захворювання. У птиць - сальмонелоносіїв збудник локалізується головним чином у печінці, тому дуже важливо проводити імуногістохімічні дослідження м'яса і печінки птиці на сальмонелоносійство з метою виявлення сальмонельозного антигену.

Відомо про ветеринарно-санітарний спосіб досліджень м'яса птиці на сальмонельоз [Руководство по ветеринарно-санитарной экспертизе и гигиене производства мяса и мясных продуктов./ Ю.Г. Костенко, М.П. Бутко, В.М. Ковбасенко и др. - М.: РИФ "Антиква", 1994. - 608с). Недоліком його є те, що за цим способом не можливо діагностувати приховане сальмонелоносійство.

Існує гістологічний спосіб дослідження м'яса [ГОСТ 19496-93 "Мясо. Метод гистологического исследования" Минск]. Спосіб складається з наступних етапів: фіксації шматочків м'язів у 10%-му розчині нейтрального формаліну, подальше заключення матеріалу у парафін за звичайною гістологічною методикою; виготовлення

гістологічних зрізів товщиною до 3-х мікрометрів; фарбування гематоксиліном та еозином. Це рішення може бути прототипом. Недоліком є те, що за цим способом визначають лише свіжість м'яса та ступінь його зрілості, а також не можна виявити сальмонелоносійство.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити імуногістохімічний спосіб експертизи м'яса і продуктів забою птиці на контамінацію сальмонелами, що включає фіксацію шматочків м'язів і печінки у 10%-му розчині нейтрального формаліну, заключення їх у парафін, виготовлення гістологічних зрізів, фарбування шляхом інкубації зрізів з поліклональними кролячими імуноглобулінами G (видовим кон'югатом), обробку зрізів антикролячими імуноглобулінами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому (антивидовим кон'югатом) та візуалізацію діамінобензидином, щоб забезпечити ефективність способу імуногістохімічної діагностики.

Спосіб здійснюється таким чином:

Для дослідження відбирають шматочки м'язів та внутрішніх органів, які фіксують у 10% розчині забуференого формаліну з подальшим заключенням у парафін. Із блоків виготовляють зрізи і проводять депарафінізацію у ксилолі протягом 15-20 хвилин. Після промивання зрізів у фосфатно - сольовому буфері на них наносять 0,2см<sup>3</sup> видового кон'югату (кролячі імуноглобуліни

(19) **UA** (11) **26855** (13) **U**

G проти сальмонели) на 20-30 хвилин. Зрізи знову промивають фосфатно-сольовим буфером і наносять  $0,02\text{см}^3$  антивидового кон'югату (козячі антикролячі імуноглобуліни G, мічені пероксидазою хрому) на 20-30 хвилин. Після промивання зрізів буфером на них двічі наносять  $0,1\text{см}^3$  діамінобензидину з метою візуалізації антигенів збудника і витримують протягом 5-10 хвилин. Після промивання дистильованою водою зрізи забарвлюють розчином гематоксиліну протягом 2-5 хвилин, знову промивають дистильованою, а потім водопровідною водою. Обробляють зрізи  $96^\circ$  етиловим спиртом і ксилолом. На останньому етапі наносять краплю полістиролу і накривають зрізи покривним склом. Порівняльний аналіз запропонованого способу та відомого прототипу показує, що спосіб відрізняється від існуючого чутливістю та конкретною спрямованістю.

При застосуванні цього способу можна досліджувати органи і тканини птиці на сальмонелозносіство, що відповідає критерію "Новизна".

#### Приклад 1

Отримання поліклональних антитіл

Для розробки імуногістохімічного способу з метою діагностики м'яса і продуктів забою птиці на контамінацію сальмонелами, застосовували кролів вагою до 2-х кілограмів. Процес виготовлення поліклональних антитіл складався з декількох етапів: гіперімунізації кролів, отримання сироватки крові кролів, виділення імуноглобуліну класу G.

Для гіперімунізації готували суспензію з наступних складових:  $1\text{см}^3$  сальмонельозного антигену,  $19\text{см}^3$  фосфатно-сольового буферу,  $0,6\text{см}^3$  диметилсульфаксиду (димексиду). Доза становила  $3\text{см}^3/\text{кг}$  живої ваги ( $1\text{см}^3$  утримував 500 тис. бактеріальних клітин). Кожну тварину гіперімунізували в крайову вухну вену, дотримуючись наступної схеми:

1-а ін'єкція- $0,5\text{см}^3$  суспензії з димексидом;

2-а ін'єкція-через 4-5 діб  $0,7\text{см}^3$  без димексиду;

3-я ін'єкція-через 4-5 діб  $1\text{см}^3$  без димексиду

Через 5-10 діб після останньої ін'єкції перевіряли результат гіперімунізації в кровокрапельній реакції аглютинації на наявність антитіл. В пробах від усіх кролів одержано позитивні результати.

Кролів знекровлювали. Кров відбирали у стерильні пробірки і відстоювали у термостаті протягом 1,5 години за температури  $37^\circ\text{C}$ . Потім розміщували в холодильнику за температури  $+4^\circ\text{C}$  на 12 годин. Після чого стерильними пастерівськими піпетками сироватку відбирали у стерильні флакони.

Синтез кон'югату пероксидази хрому з IgG проводили за методом Накане.

#### Приклад 2

Зараження курчат *Salmonella enteritidis*

Для проведення досліджень було сформовано дві групи курчат по 50 голів у кожній. Першу групу курчат (дослідну) заражали орально суспензією *Salmonella enteritidis* за допомогою приєднаного до шприца гнучкого катетеру у дозі  $0,2\text{см}^3$  на тварину ( $1 \times 10^5$  мікробних тіл на тварину). Для цього

використовували штам *S. enteritidis* дикого типу - М №8. Штам культивували на звичайному МПА, режим культивування 48 годин за температури  $37^\circ\text{C}$ . Культуру змивали з агару 0,9% стерильним фізіологічним розчином. Готували суспензію з концентрацією  $5 \times 10^5$  (500000) мікробних тіл в  $1\text{см}^3$  у відповідності з оптичними стандартами мутності. Робоче розведення готували на стерильному МПБ. Друга група курчат - контроль (інтактна птиця).

Для проведення другої серії дослідів було сформовано також дві групи курчат по 35 голів у кожній. Зараження проводили внутрішньом'язево тією ж суспензією, але у дозі  $0,1\text{см}^3$  на тварину.

Курчат забивали на 5-у, 8-у, 10-у, 13-у, 15-у, 17-у, 21-у та 51-у добу після зараження (в першій серії дослідів) та на 15-у, 30-у і 45-у добу (у другій серії дослідів). Від курчат відбирали шматочки м'язів та печінки. Органи фіксували у забуференому формаліні з подальшим виготовленням гістологічних препаратів.

#### Приклад 3

Випробування запропонованого способу в лабораторних умовах

Перед проведенням реакції проводили розведення компонентів реакції. Спочатку розводили видовий кон'югат (кролячі імуноглобуліни G). Для чого до  $0,001\text{см}^3$  видового кон'югату додавали  $2\text{см}^3$  0,9% стерильного фізіологічного розчину. Потім розводили антивидовий кон'югат (козячі антикролячі імуноглобуліни G мічені пероксидазою хрому) розчинником для антитіл (Antibody diluent) До  $0,001\text{см}^3$  антивидового кон'югату додавали  $0,2\text{см}^3$  розчиннику для антитіл. Після цього проводили розведення діамінобензидину (DAB), для чого до  $0,02\text{см}^3$  DAB додавали  $1\text{см}^3$  субстратного DAB буферу. Наступним етапом після процедури розведення компонентів було проведення самої імуногістохімічної реакції, яка описана вище.

Запропонований спосіб імуногістохімічної діагностики прихованого сальмонелозносіства курей є новим та ефективним. Його можна рекомендувати для впровадження у практику ветеринарної медицини (діагностичних лабораторій ветеринарної медицини).