



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38467** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 39/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ У КРОВОКРАПЛИННІЙ РЕАКЦІЇ АГЛЮТИНАЦІЇ**

1

2

(21) u200810256

(22) 11.08.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ЗАВГОРОДНІЙ АНДРІЙ ІВАНОВИЧ, UA, СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, UA, ПОЗМОГОВА СВІТЛАНА АРКАДІЇВНА, UA, ШАПОВАЛОВА ОЛЬГА ВІКТОРІВНА, UA, АЛЕКСЄЄВА НАТАЛІЯ ВІКТОРІВНА, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-

ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA

(57) Спосіб одержання антигену для діагностики туберкульозу у кровокраплинній реакції аглютинації, що включає інактивацію, виготовлення бактеріальної маси, який відрізняється тим, що інактивацію бактеріальної маси проводять за допомогою автоклавування при 0,5 атм. протягом 60 хвилин з антигеном, який вміщує 5 мг/см³ бактеріальних клітин.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології та імунології, зокрема до способу одержання діагностичного препарату для прижиттєвої діагностики туберкульозу у птиці.

Існують методи одержання антигену у реакції аглютинації (РА), що передбачають виготовлення антигену із інактивованої формаліном або фенолом бактеріальної маси збудника туберкульозу *M. avium* за температури 80°C [А.В. Прохоров «Новый метод прижизненной диагностики туберкулеза птицы», «Ветеринария» - 1958, №9 - с.60-64; А.Я. Фомина, Л.Т. Контримавичус, А.В. Прохоров «К вопросу методики изготовления туберкулезного антигена», «Ветеринария» - 1960, №6 - с.30-31].

Основним недоліком цих антигенів є недостатня чутливість, пов'язана з неоднорідністю гомогенізації та самоаглютинації антигенів, зумовлена хімічними речовинами, які застосовуються при інактивації бактеріальної маси.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого рішення є одержання антигену із бактеріальної маси 20-добової культури *M. avium*, яка вирощена на картопляному живильному середовищі та інактивована 0,3% розчином формаліну протягом 7 діб за температури 37°C та подальшим виготовленням суспензії антигену у стерильному фізіологічному розчині, що вміщує 0,2% формаліну та 0,4% натрію цитрату з концентрацією 10¹⁰ бактеріальних клітин в 1см³ (*M. Pozanska, Preparation of antigen for whole blood rapid agglutination test and its specificity for diagnosis of avian tuberculosis. Bull. Vet. Inst/Pulawi, 9 (1), 20-25.*)

Недоліком даного способу є недостатня біологічна активність антигену в кровокраплинній реак-

ції аглютинації (ККРА) та самоаглютинація при температурі від 0°C до -2°C.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання антигену для діагностики туберкульозу у кровокраплинній реакції аглютинації (ККРА), що включає інактивацію, виготовлення бактеріальної маси шляхом інактивування бактеріальної маси за допомогою автоклавування при 0,5атм. протягом 60 хвилин з антигеном, який вміщує 5мг/см³ бактеріальних клітин.

Порівняльний аналіз заявленого способу виготовлення антигену з прототипом свідчить про те, що заявлений спосіб виготовлення антигену із *M. avium* відрізняється від відомого тим, що інактивацію бактеріальної маси проводять шляхом автоклавування при 0,5атм. протягом 60 хвилин, а концентрацію бактеріальних клітин доводять до 5мг/см³ розчинника, що відповідає критерію "новизна".

Одержаний таким чином антиген із штаму *M. avium* є специфічним, активним препаратом, який не володіє самоаглютинуючими властивостями та дозволяє виявляти на ранніх стадіях інфекційного процесу хвору туберкульозом та анергічну до туберкуліну птицю.

Виготовлення антигену здійснюють таким чином:

Вирощену на картопляному середовищі Павловського бактеріальну масу штаму *M. avium* інаktivують в автоклаві при 0,5атм. протягом 60 хвилин. Отриману інактивовану бактеріальну масу бактеріальною петлею переносять у попередньо зважені 200см³ флакони з намістом та гомогенізують на шутель-апараті у стерильному фізіологі-

(13) **U**(11) **38467**(19) **UA**

чному розчині, що вміщує 0,1% формаліну та 0,4% натрію цитрату до кінцевої концентрації бактеріальної маси 1мг/см³ розчину. До одержаного таким чином антигену додають 0,003% малахітового зеленого. Отриманий таким чином антиген перевіряють на активність та специфічність з кров'ю здорових та хворих на туберкульоз курей в ККРА.

ККРА проводять на предметних скельцях при температурі 18-20°C таким чином. На предметне скельце наносять краплину антигену в об'ємі 0,03см³ та змішують з 0,04см³ крові від хворої на туберкульоз птиці. Другу краплину антигену (0,03см³) змішують з 0,03см³ крові від здорових курей. Облік реакції враховують через 2 хвилини. Результат вважають позитивним при появі дрібних або крупних скупчень у вигляді піску світло-сірого кольору та просвітлення рідини з кров'ю хворих курей. При негативній реакції рідина (антиген + кров) залишається гомогенною без просвітлення та утворення піщинок з кров'ю здорових курей.

Приклад №1. Антиген виготовляють із інактивованої бактеріальної маси як вказано вище при концентрації бактеріальних клітин 1мг/см³ розчину, отриманий антиген перевіряють на активність і специфічність з цільною кров'ю здорових та хворих туберкульозом курей.

Приклад №2. Так само, як і в прикладі №1 тільки концентрація бактеріальних клітин становить 3мг/см³ розчину.

Приклад №3. Так само, як і в прикладі №1, тільки концентрація бактеріальних клітин стано-

вить 5мг/см³ розчину.

Результати активності і специфічності виготовлених антигенів в порівнянні з прототипом приведені в таблиці.

З матеріалів таблиці видно, що при дослідженні проб крові від інфікованої *M. avium* птиці з антигеном, що вміщував 1мг/см³ бактеріальних клітин, позитивну ККРА відмічали на 15 добу тільки у 1 голови, 3мг/см³ - у 4 голів, 5мг/см³ - у 5 голів, а на 20 добу у 3 голів, 4 голів та 6 голів відмічено тоді, як з антигеном-прототипом на 15 добу позитивна ККРА встановлена у 4 голів, 20 добу - 5 голів та на 30-40 добу - у 6 голів. Через 30 діб позитивна ККРА була встановлена у птиці з антигеном 1мг/см³ у 5 голів, 3мг/см³ - 6 голів і 5мг/см³ - 6 голів, а на 40 добу після ін'єкції *M. avium* позитивна ККРА з антигеном була встановлена у всіх хворих туберкульозом курей.

При дослідженні проб крові від контрольної групи курей в ККРА з дослідним антигеном при п'яти дослідженнях отримано негативний результат, а з антигеном-прототипом в одному випадку сумнівна реакція та самоаглютинація в контролі.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що антиген із штаму *M. avium*, який вміщує 5мг/см³ бактеріальних клітин не володіє самоаглютинуючими властивостями, має високу активність і специфічність та дозволяє на 5-10 добу виявити інфіковану збудником туберкульозу *M. avium* хвору птицю.

Таблиця

Спосіб одержання антигену для діагностики туберкульозу у крокраплинній реакції аглютинації (ККРА)

Кількість заражених голів	Реагували з антигенами в ККРА через діб (гол)																				
	Досліджуваний антиген															Прототип					
	1мг/см³					3мг/см³					5мг/см³										
	10	15	20	30	40	10	15	20	30	40	10	15	20	30	40						10
1	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Контроль (здорові кури) 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Контроль (фіз. роз- чин)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-