



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50425** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ АНТИГЕНУ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ СЕТАРІОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

2

(21) u200912535

(22) 03.12.2009

(24) 10.06.2010

(46) 10.06.2010, Бюл.№ 11, 2010 р.

(72) СОРОКА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, СЕМЕНКО
ОЛЕНА ВАЛЕНТИНІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

(57) Спосіб виготовлення антигену для серологічної діагностики сетаріозу великої рогатої худоби,

що включає відбір статевозрілих сетарій *Setaria labiatarapillose*, їх гомогенізацію, який **відрізняється** тим, що сетарій великої рогатої худоби *Setaria labiatarapillose* гомогенізують 40-60 хв., проводять центрифугування суспензії гомогенізованих збудників з фізіологічним розчином 15 хв. при 6000 об/хв. і додають у отриману суспензію натрію азид з розрахунку 1:10000.

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

Відомі методи досліджень на філяріатози Попової, Кнотта (Рекомендації з гельмінтологічних досліджень тварин / Пономар С.І., Сорока Н.М., Абрамов А.В., Литвиненко О.П. - Біла Церква, 2008. - С. 30-31), недоліками яких є те, що у більшості з них використовують 1-2мл крові, де не завжди можна виявити збудника. Крім того, кров для таких досліджень потрібно консервувати і відбирати в період активності проміжного хазяїна (комарів), що ускладнює роботу дослідника. Використання імунологічної (серологічної) діагностики взагалі знімає ці питання, оскільки ґрунтується на інших принципах виявлення збудника хвороби, а саме виявлення утворених при наявності збудника в організмі тварини комплексів антиген-антитіло, які виявляють у сироватці крові.

Найближчим аналогом до способу виготовлення антигену для серологічної діагностики сетаріозу великої рогатої худоби є виготовлення антигену для алергічної діагностики сетаріозу А.Я. Лукін, І.І. Кленін та ін. (Иммунологическая диагностика сетариоза крупного рогатого скота / А.Я. Лукин, И.И. Кленин, А.С. Савицкая, Е.А. Ефремова // Тр. Оренбург: СХИ, 1958. - Т. 8. - С. 211-219.).

Недоліками даного способу є складність у виконанні та необхідність проведення діагностичних досліджень безпосередньо на тварині, оскільки антиген вводять внутрішньошкірно і за алергічної реакцією на введений антиген враховують результати діагностики. Наявність великої кількості не-

справжньо позитивних реакцій на введення антигену тварині (низька специфічність) в тому числі через недостатнє гомогенізування збудників. Антиген не містить консерватора, тому не може тривалий час зберігатись у умовах побутового холодильника (температура +2-4°C).

Корисною моделлю ставиться завдання створення антигену для серологічної діагностики сетаріозу великої рогатої худоби, який би мав високу специфічність до збудника хвороби, був простим у виконанні, дозволив проводити діагностику з низьким рівнем паразитемії та у носіїв інвазії, мав би тривалий термін зберігання.

Поставлене завдання досягається використанням статевозрілих сетарій *Setaria labiatarapillosae*, проведенням ретельної гомогенізації не менше 60хв та центрифугування 6000об/хв 15хв в умовах стерильності робить його придатним для використання в серологічній діагностиці, що значно полегшує проведення діагностики хвороби адже використовують лише сироватки крові тварин, антиген виготовлений таким чином має високу специфічність, що зменшує кількість несправжньо-позитивних реакцій. За рахунок внесення до його складу азида натрію він може тривалий час зберігатись при температурі +2-4°C (за нашими спостереженнями не менше 12міс).

Для виготовлення антигену необхідно мати статевозрілих сетарій *Setaria labiatarapillosae*, гомогенізатор, центрифугу, центрифужні та лабораторні пробірки, фізіологічний розчин та азид натрію в якості консерванту.

(13) **U**
(11) **50425**
(19) **UA**

Спосіб здійснюється наступним чином: відбираємо (при кастрації бугайців та великої рогатої худоби, що була забита) статевозрілих сетарій *Setaria labiatarapillosae*, зібраних гельмінтів гомогенізуємо в гомогенізаторі протягом 60хв. Після проведеної гомогенізації до отриманої суспензії додаємо фізіологічний розчин в співвідношенні 2:1 та центрифугуємо 15хв при 6000об/хв, консервуємо азидом натрію з розрахунку 1:10000 і проводимо гомогенізування суспензії паразитів вручну струшуванням протягом однієї години. Отриману суспензію перевіряємо на чистоту методом мікроскопії виготовлених з неї мазків. Флакони з виготовленим антигеном щільно закриваємо кришками, наклеюємо етикетку і зберігаємо в камері побутового холодильника при температурі +2-4°C.

Всі роботи проводили з дотриманням стерильності і при постійному контролі пофарбованих мазків під мікроскопом (ок. 7-10 х об. 20-40).

Виготовлений антиген перевіряли на активність, відсутність антикомплементарних властивостей, гемотоксичність. Також визначали робочий титр в РТЗК в об'ємі 0,2см³ з завідомо позитивними сироватками високого (не нижче 1:80) та низького (не менше 1:5) титрів, отриманих від хворих тварин та з завідомо негативними сироватками (в титрі 1:5). Перевіряли антиген на специфічність з сироватками крові великої рогатої худоби, що перехворіли на інші паразитарні хвороби в титрі 1:5.

Антиген розводили в титрі 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100. Позитивні та негативні сироватки крові розводили, як зазначено вище, та інактивували 30хв при температурі +58-59°C. Позитивні сироватки розводили до їх граничних титрів. Комплемент і гемолізін використовували у їх робочих титрах.

Облік реакції проводили за співвідношенням гемолізованих еритроцитів (у відсотках) та виражали у хрестах за схемою: 4 хрести – відсутність гемолізу: надосадова рідина прозора і безбарвна; 3 хрести - гемоліз 25% еритроцитів; 2 хрести - гемоліз 50% еритроцитів; 1 хрест - гемоліз 75% еритроцитів; мінус - повний гемоліз еритроцитів, осад відсутній, рідина інтенсивно забарвлена гемоглобіном. Для контролю антигену використовували ряд пробірок з фізіологічним розчином замість сироваток, в які додавали ті ж самі компоненти. Проводили контроль гемолітичної системи (фізіологічний розчин з гемолітичною системою).

Проведеними дослідженнями на антикомплементарність встановлено, що виготовлений нами антиген не володіє антикомплементарними властивостями. Так, з комплементом, гемолізином у робочих титрах та 3% еритроцитів барана він викликав повний гемоліз гемолітичної системи. Антиген не гемотоксичний (викликав повну затримку гемолізу з 3% розчином еритроцитів барана та фізіологічним розчином) та специфічний (з сироватками, отриманими від великої рогатої худоби, хворої не на сетаріоз, відмічали повний гемоліз еритроцитів барана).

Титр антигену (найменша його доза - найбільше розведення), при якому припинялась затримка гемолізу і наставав повний гемоліз в нашому досліді і становив від 1:25 до 1:100.

Отже, отриманий за запропонованою нами методикою антиген виявився специфічним, не гемотоксичним, не володів антикомплементарними властивостями. Він може використовуватись для серологічної діагностики сетаріозу великої рогатої худоби (ВРХ), спричиненому *Setaria labiatarapillosae*, в титрах від 1:25 до 1:100.