



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18387 (13) U  
(51) МПК (2006)  
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 З АТЕНУЙОВАНИХ ЗБУДНИКІВ EIMERIA TENELLA

1

2

(21) u200603874

(22) 07.04.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Приходько Юрій Олександрович, Стегній Борис Тимофійович, Сентюрін Володимир Віталійович, Маршалкіна Тетяна Вікторівна

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб виготовлення антигену з атенуйованих збудників Eimeria tenella, що включає селекцію збудників, флотацію насиченим розчином, ізолювання та накопичення збудників еймерій, який **відрізняється** тим, що використовують аміачну селітру щільністю 1,3 г/см<sup>3</sup> як насичений флотаційний розчин, ізолюють виділені ооцисти еймерій з посліду.

Корисна модель відноситься до ветеринарії, а саме до способів атенування збудників еймеріозу курей при виготовленні антигену для специфічної профілактики захворювання.

Еймеріоз – інвазійне протозойне захворювання, що завдає значних економічних збитків галузі птахівництва, які складаються зі збитків від загибелі молодняку, різкого зниження продуктивності, значних витрат на придбання кокцидіостатиків. Головним недоліком цих препаратів є те, що вже після певного часу їх застосування у збудників виникає резистентність до хіміопрепаратів. Такий факт вимагає постійної розробки нових кокцидіостатиків (це і пояснює великий арсенал цих препаратів), що потребує дуже великих коштів. До того ж вказані препарати небезпечні в екологічному відношенні - ці препарати та продукти їх метаболізму після надходження в організм можуть тривалий час накопичуватися в різних органах і тканинах.

Існують способи отримання протективних еймерійних антигенів, які полягають в ослабленні вірулентності збудників еймеріозу шляхом вміщування їх у 6% розчин фенолу, при t 40°C протягом 15 хвилин [Сентюрін В.В. Влияние зараженности цыплят на формирование противоеймерийного иммунитета. // Наукові досягнення в галузі вет.медицини: Матеріали міжнародн.наук.-практ.конф.молодих вчених. - Харків, 1997. - С.68-69]. Дія розчину фенолу зменшує вірулентність еймерій настільки, що за умов введення їх в організм курчат у летальній дозі, не викликає захворювання. Імуногенність еймерій зберігається на невисокому рівні, тобто виготовлені таким чином

антигени, не забезпечують формування в організмі курчат стійкого імунітету.

Є спосіб одержання антигенів руйнуванням збудників еймеріозу ультразвуковою дезінтеграцією неспоркульованих ооцист [Сентюрін В.В., Коваленко І.І., Сумцов В.С. Проблеми механізму протиеймерійного імунітету у кролів. // Розвиток ветеринарної науки в Україні: здобутки та проблеми: 36. матеріалів наук.-практ.конф. - Харків, 1997. - С.85]. При цьому були одержані позитивні результати з специфічної профілактики захворювання, але розробка вакцини, отриманої з таких антигенів потребує дуже великої кількості збудників, птахів-донорів.

Аналіз джерел інформації свідчить про наявність можливості одержання протиеймерійної вакцини з атенуйованих збудників способом їх селекції на прискорений розвиток - збудники із скороченим препатентним періодом розвитку [Jeffers T.R. New battles with an old enemy - Coccidiosis control in the year 2000 // Poultry Diss. - 1987. Vol.46. - N 539. P.30-38; Murray P.K Immune reactions to Eimeria infections and artificial immunization of chickens // Abstracts. - 23. World veterinary Congr. - Montreal, 1987. - P.70].

Цей спосіб може бути прототипом. Недоліком цього рішення є недостатня щільність флотаційного розчину. В порівнянні з прототипом новим є застосування комбінованого способу флотації за умов ізолювання збудників захворювання з посліду. Під час виготовлення антигену використовуються насичений розчин аміачної селітри (щільність - 1,3) на відміну від насиченого розчину нітрату натрію (щільність- 1,2) застосованого в

UA (11) 18387 (13) U

прототипі. Отже більша щільність флотаційного розчину порівняно з прототипом, дозволяє набагато більше ізолювати та накопичити збудників атенуйованих еймерій.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення антигену з атенуйованих збудників *Eimeria tenella*., що включає селекцію збудників, флотацію насиченим розчином, ізолювання та накопичення збудників еймерій шляхом використання аміачної селітри щільністю 1,3 як насиченого флотаційного розчину, ізолювання виділених ооцист еймерій з посліду, щоб забезпечити спосіб виготовлення антигену.

Спосіб здійснюють у такій послідовності

З птахо господарств неблагополучних по еймеріозу відбирали послід птиці, який досліджували на наявність ооцист еймерій. Накопичення матеріалу проводили у тому разі, якщо при видовій ідентифікації збудників питома вага ооцист *E.tenella* становила не менше 80%, а інтенсивність інвазії перевищувала 1млн. ооцист в 1см<sup>3</sup> посліду. Збудників з посліду ізолювали, застосовуючи для флотації насичений розчин аміачної селітри (щільність - 1,3). Отриману біомасу еймерій піддавали очищенню, в декілька етапів: великі механічні домішки видаляли фільтруванням через металеве ситечко, розміром чарунок 1мм<sup>2</sup>; дрібні домішки видаляли диференційним центрифугуванням матеріалу триразове за такими режимами: перший раз - при 2000об/хв. протягом 10 хвилин, другий - при 1500об/хв протягом 5 хвилин, третій - при 700об/хв. також протягом 5 хвилин. Для інактивації супутньої мікрофлори суспензію найпростіших обробляли антибіотиками (пеніцилін із стрептоміцином по 1000ОД на 1см<sup>3</sup> суспензії, в якій містилося 500 тисяч збудників) протягом 24 години. Після відмивання біомаси від антибіотиків проводили спорудження одержаних еймерій. Після чого проводили зараження курчат. Кількість ооцист в 1см<sup>3</sup> суспензії підраховували в камері Горяєва. З моменту інвазування за птицею вели спостереження, відмічаючи клінічні ознаки. Періодично від птахів відбирали послід і досліджували на наявність ооцист еймерій. З початком патентного періоду, з посліду дослідної птиці відбирали перших виділених ооцист (протягом першої доби). Таким чином було отримано найпростіших, у яких препатентний період менш тривалий (отже вони чинили менш патогенний вплив на клітини організму птиці), ніж у тих, які виділяються з організму пізніше. Щоб отримати лінію збудників, у яких ця ознака (скорочений цикл розвитку) була б закріплена генетичне, застосовували селекційний метод. Для цього провели 10 пасажувань отриманих паразитів через організм молодняка курей за описаною вище схемою з відбором кожного разу перших виділених з організму ооцист. Після останнього зараження дослідного поголів'я з посліду ізолювали виділених ооцист протягом усього патентного періоду. Потім готували суспензію найпростіших в 1% розчині двофосфатного калію з розрахунку 500 тисяч в 1см<sup>3</sup>, яку зберігали при температурі від 2 до - 4°С.

Приклад 1. Виготовлення лінії із еймерій виду *E.tenella* зі скороченим циклом розвитку. Було

сформовано групу курчат 28-добового віку, вільних від еймерій, в кількості 20 голів. Для зараження дослідного поголів'я використовували накопичені ооцисти еймерій після їх спорудження. Інвазійних збудників вводили птиці ентально в дозі 150 тисяч на 1кг маси курчат. Після інвазування кожної доби від птахів відбирали послід, який досліджували на наявність ооцист еймерій. З початком патентного періоду з посліду дослідної птиці відбирали перших виділених ооцист (погодинно, протягом першої доби). Відібрані від птиці еймерії з прискореним розвитком використовували для послідовного зараження птиці, тобто проводили другий пасаж на курчатах по вище описаній схемі, потім третій, четвертий і т.д. (усього провели 10 пасажувань паразитів через організм молодняка курей 28 - 30-добового віку з використанням по 10 голів у кожному пасажі) з відбором кожного разу перших виділених з організму ооцист.

Приклад 2. Визначення патогенності та імуногенності еймерій *E.tenella* зі скороченим циклом розвитку. Було сформовано шість груп курчат 30-добового віку, вільних від еймерій, по 10 голів у кожній. Для проведення досліджень антиген приготували таким чином, що 1см<sup>3</sup> його вміщував кількість споруджених атенуйованих ооцист, яка відповідала б абсолютній летальній дозі вихідних вірулентних збудників у розрахунку на 1кг живої ваги. Після проведення паразитологічних досліджень птиці першої групи антиген задавали в дозі 0,5см<sup>3</sup> на 1кг маси тіла, другої - 1,0см<sup>3</sup>, третьої - 1,5см<sup>3</sup>, четвертої - 2см<sup>3</sup>. Доза ооцист для птахів четвертої групи відповідала абсолютній летальній дозі (ЛД<sub>100</sub>) ооцист вихідних вірулентних еймерій. Курчата п'ятої і шостої груп були контрольними і антигену не отримували. Через 21 добу після застосування антигену всіх курчат, крім шостої контрольної групи, інвазували вихідними вірулентними збудниками в дозі ЛД<sub>100</sub>. Дослідження показали, що після введення антигену, до зараження у птахів перших трьох та контрольних груп відхилень у загальному стані не було. В четвертій групі відмічали незначне пригнічення, зменшення апетиту; через 3 доби з початку клінічного прояву стан поголів'я повністю нормалізувався.

Розроблений антиген з атенуйованих збудників еймеріозу не спричиняв патогенного впливу на організм курчат. Після зараження в третій та в четвертій групах протягом періоду спостережень клінічних ознак еймеріозу не відмічали. В першій та другій групах у декількох птахів реєстрували важку та легку форму еймеріозу. У контрольній групі захворіли і загинули всі курчата. Тобто введений антиген з атенуйованих збудників еймеріозу володів вираженими протективними властивостями вакцини.

Антиген, який отриманий способом атенування збудників еймерій курей *E.tenella*, що мають знижену, в порівнянні з вихідними штамми вірулентність і високу імунізуючу здатність, можливо використовувати при розробці вітчизняної проти-еймерійної вакцини, яка в подальшому буде застосована в птахогосподарствах України.

