



МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **117901** (13) **U**
(51) МПК
A61K 39/02 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 01313	(72) Винахідник(и): Болотін Віталій Ігорович (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Обуховська Ольга Валеріївна (UA), Драгуть Світлана Сергіївна (UA), Близнецов Олексій Геннадійович (UA), Куценко Валентина Анатоліївна (UA), Рамазанова Таїсія Петрівна (UA), Марченко Наталія Віталіївна (UA), Вовк Сергій Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 13.02.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2017, Бюл.№ 13	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІСТЕРІОЗНОГО АНТИГЕНУ ІЕКВМ ДЛЯ РЕАКЦІЇ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КОМПЛЕМЕНТУ (РЗК)

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплексу (РЗК), що включає культивування на живильному середовищі суміші бактерій штамів, виготовлення мікробних суспензій, виділення антигенних детермінант лістерій. Виділення антигенних детермінант лістерій здійснюють екстрагуванням з використанням спирту та діетилового ефіру, культивування здійснюють, використовуючи суміші бактерій зі штамів "Буринь", "Тернопіль", "№ 1" та "К № 17" у S-формі, як живильне середовище використовують агар Мартену з глюкозою 0,5-1 %.

UA 117901 U

Корисна модель належить до ветеринарної і медичної мікробіології та імунології, зокрема до методики виготовлення антигену з бактерій-збудників лістеріозу (*Listeria monocytogenes*) для виявлення протилістеріозних антитіл.

Антиген лістеріозний ІЕКВМ призначений для прижиттєвої діагностики лістеріозу сільськогосподарських тварин в реакції зв'язування комплементу (РЗК). Лістеріозний антиген специфічний, а саме - забезпечує позитивну реакцію з лістеріозними сироватками та не проявляє позитивних реакцій з нормальними, гетерологічними сироватками та без сироваток, а також не має антикомплемента та гематоксичних властивостей.

Існують лістеріозні антигени, в яких використовуються російські штами. Так, є лістеріозний антиген зі штаму *Listeria monocytogenes* ВГНКИ № D/73 [АС СРСР № 1238293 від 29.04.83, МПК А61К39/02] та лістеріозний антиген зі штаму *Listeria monocytogenes* ВГНКИ № D/7-2 [АС СРСР № 1238292 від 29.04.83, кл. А61К39/02]. Недоліком є саме використання російських штамів.

Відомий спосіб виготовлення лістеріозного антигену [АС СРСР № 1441520 А, МПК. А61К39/02 від 15.09.1992 р. Спосіб получения листериозного антигена]. Це рішення може бути прототипом.

Недоліком цього рішення є те, що для виділення антигенних детермінант застосовують метод балістичної дезінтеграції. Даний спосіб вимагає спеціального високовартісного обладнання.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплементу (РЗК).

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплементу (РЗК), що включає культивування, виготовлення мікробних суспензій, виділення антигенних детермінант лістерій, згідно з корисною моделлю, виділення антигенних детермінант лістерій здійснюють екстрагуванням з використанням спирту та діетилового ефіру. Культивування здійснюють, використовуючи суміші бактерій зі штамів "Буринь", "Тернопіль", «№ 1" та "К № 17" у S-формі, як живильне середовище використовують агар Мартену з глюкозою 0,5-1 %.

Спосіб виконують таким чином:

Виконання способу виготовлення антигену включає вирощування виробничих штамів лістерій "Буринь", "Тернопіль", «№ 1" та "К № 17" двох серогруп (по 2 штами на серогрупу) окремо на поживному середовищі за температури 37 °С протягом 24-48 годин. Культури мікробів, що вирости, змивають стерильним фізіологічним розчином, змішують та центрифугують впродовж 20 хвилин за режиму 2000-4000 об/хв. Виділення антигенних детермінант лістерій здійснюють шляхом екстрагування за допомогою спирту та діетилового ефіру. Осадження біомаси здійснюють центрифугуванням за 2000-4000 об/хв. протягом 20 хвилин. Таку обробку антигену повторюють декілька разів. Лістерії у концентрації 50 млрд. КУО/см³ консервують 1 %-м розчином борної кислоти. Готовий антиген розливають у флакони і піддають контролю. Лістеріозний антиген ІЕКВМ - безбарвна рідина з осадом молочно-білого кольору з дещо сіруватим відтінком, який розбивається при збовтуванні в однорідну суспензію.

Приклад 1

Визначали повноту інактивації антигену. Для цього з 3-х флаконів експериментальної серії антигену, виготовленого за методикою, що заявляється, робили посіви на МПА, МПБ в пробірках. Посіви витримували в термостаті за температури (37-38)°С протягом 5 діб. Таким чином визначали повноту інактивації. Антиген був інактивованим.

Приклад 2

Визначали стерильність антигену. Для цього з 3-х флаконів експериментальної серії антигену, виготовленого за методикою, що заявляється, робили посіви на тіогліколеве середовище в пробірках. Посіви витримували в термостаті за температур (30-35)°С та (20-25)°С протягом 14 діб. Таким чином визначали стерильність. Антиген був стерильним.

Приклад 3

Для випробування використовували 3 флакони експериментальної серії антигену, виготовленого за методикою, що заявляється. Антиген збовтували і розводили 1:50, 1:100, 1:200 і 1:400 по 10 см³ кожного розведення з кожного флакону. Для цього в першу пробірку (флакон) наливали 19,6 см³ фізіологічного розчину, а в решту - 3 пробірки по 10 см³ фізіологічного розчину. Потім знову в першу пробірку (флакон) вносили 0,4 см³ збовтаного антигену, який вміщував 50 млрд. бактерійних клітин у 1 см³ і ретельно змішували. З першої пробірки переносили 10 см³ суспензії в другу, струшували, потім з другої переносили в третю, а з третьої, після струшування, в четверту. Постановку РЗК проводили загальноприйнятим методом у об'ємі 1 см³.

Для перевірки лістеріозного антигену на антикомплементарність і гемотоксичність в один ряд пробірок вносили подвійну дозу кожного з розведень антигену (0,4 см³), 0,2 см³ комплементу в робочому титрі, 0,4 см³ гемолітичної системи; в другий ряд пробірок вносили подвійну дозу кожного з розведень антигену (0,4 см³), 0,2 см³ фізіологічного розчину (замість комплементу), 0,4 см³ гемолітичної системи у робочому титрі.

Обидві фази реакції (зв'язування комплементу і головний дослід) проходили у водяній бані за температури (37-38)°С, кожна протягом 20 хвилин.

Робочим титром лістеріозного антигену вважали подвоєну його концентрацію проти граничного титру, тобто розведення 1:100 (табл. 1).

Приклад 4

Активність і специфічність експериментальної серії антигену, виготовленого за методикою, що заявляється, визначали одночасно в РЗК з комерційними та експериментальними позитивними лістеріозними, нормальними, гетерологічними позитивними бруцельозними (*Brucella abortus*, *Brucella ovis*) сироватками крові кролів та овець (табл. 2).

Таким чином, спосіб виготовлення антигену для серологічної діагностики лістеріозу тварин в РЗК є простим у виконанні, не потребує коштовного лабораторного обладнання та дозволяє отримати активний та специфічний діагностичний засіб. Лістеріозний антиген проявляє позитивну реакцію з лістеріозними сироватками і не реагує з нормальними та гетерологічними сироватками та без сироваток, а також не має антикомплементарних та гемотоксичних властивостей. Антиген лістеріозний ІЕКВМ призначений для прижиттєвої діагностики лістеріозу сільськогосподарських тварин в реакції зв'язування комплементу (РЗК) і може використовуватись у лабораторіях ветеринарної медицини.

Таблиця 1

Спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплементу (РЗК)

Розведення експериментального зразку антигену	Розведення позитивної лістеріозної сироватки						Негатив на сироватка	Контроль антигену на антикомплементарність	Контроль антигену на гемотоксичність
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320			
1:50	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	++++
1:100	++++	++++	++++	++++	++	-	-	-	++++
1:200	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-	++++
1:400	+++	+++	++	++	-	-	-	-	++++
Контроль без антигену	-	-	-	-	-	-	-		

Таблиця 2

Спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплементу (РЗК)

Кількість кролячих та овечих сироваток крові	Час обліку реакції	Результат РЗК		
		позитивно	сумнівно	негативно
20 лістеріозних	зразу	20	0	0
	через 14-18 годин	20	0	0
20 нормальних	зразу	0	1	19
	через 14-18 годин	0	0	20
20 гетерологічних	зразу	0	0	20
	через 14-18 годин	0	0	20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення лістеріозного антигену ІЕКВМ для реакції зв'язування комплементу (РЗК), що включає культивування на живильному середовищі суміші бактерій штамів, виготовлення мікробних суспензій, виділення антигенних детермінант лістерій, який **відрізняється** тим, що виділення антигенних детермінант лістерій здійснюють екстрагуванням з використанням спирту та діетилового ефіру, культивування здійснюють, використовуючи суміші бактерій зі штамів

"Буринь", "Тернопіль", "№ 1" та "К № 17" у S-формі, як живильне середовище використовують агар Мартену з глюкозою 0,5-1 %.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601