



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **146566** (13) **U**
(51) МПК (2021.01)
C12N 1/02 (2006.01)
A61K 39/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 05754**
(22) Дата подання заявки: **07.09.2020**
(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **04.03.2021**
(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **03.03.2021, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):
**Болотін Віталій Ігорович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Завгородній Андрій Іванович (UA),
Полторацька Ганна Анатоліївна (UA),
Рамазанова Таїсія Петрівна (UA)**
(73) Володілець (володільці):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ШТАМУ YERSINIA ENTEROCOLITICA СЕРОТИП O:3 Л/134 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ АНТИГЕНУ ТА СИРОВАТКИ ДЛЯ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ІЕРСИНІОЗУ ТВАРИН

(57) Реферат:

Спосіб одержання штаму Yersinia enterocolitica серотип O:3 Л/134 для виготовлення антигена та сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей культури Yersinia enterocolitica. При цьому клонують культуру Yersinia enterocolitica в розведенні від $1:10^{-1}$ до $1:10^{-8}$ для відбору поодиноких колоній та інкубують протягом 48 годин з додаванням сироватки крові ВРХ.

UA 146566 U

UA 146566 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології, зокрема стосується підбору виробничого штаму *Yersinia enterocolitica* серотип О:3Л/134 для виготовлення антигена та позитивної сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин.

Кишковий ієрсиніоз - широко розповсюджене захворювання в світі, зокрема в країнах із розвиненим тваринництвом, причиняє значні економічні збитки. Ієрсиніозна інфекція, викликана *Yersinia enterocolitica*, є небезпечним зооантропонозом, і належить до групи харчових зоонозів.

Існує штам *Yersinia enterocolitica* 075-2Д серотип О:5, що використовується для виготовлення антигена та аглютинуючої діагностичної сироватки ("Штам бактерій *Enterocolitica* 075-2Д серологічний варіант О:5 для виготовлення антигена та аглютинуючої діагностичної сироватки", Патент UA 23708U, МПК С12N1/2, А61К39/02, опубл. 11.06.2007 р.) Недоліком штаму є те, що він у серологічних реакціях (РА, РЗК, РТЗК) не виявляє інфікованих тварин на першій стадії розвитку інфекційного процесу.

Відомий штам *Yersinia enterocolitica* 37 серотипу (Авторське свідоцтво SU 1789558 А1, МПК С12N1/20, А61К39/40 // (С12N1/20, С12R1/01, опубл. 23.01.1993 р.), який одержують за допомогою відбору, висіву клонів та застосовують для отримання діагностичної аглютинуючої моноваріантної сироватки. Це рішення може бути прийняте за найближчий аналог. Недоліком є те, що у серологічних реакціях (РА, РЗК, РТЗК) цей штам не виявляє інфікованих тварин на першій стадії розвитку інфекційного процесу та має недостатню кількість виходу антигена.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання штаму *Yersinia enterocolitica*, серотип О:3Л/134, для виготовлення антигена та сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей культури *Yersinia enterocolitica* шляхом клонування культури *Yersinia enterocolitica* в розведенні від $1:10^{-1}$ до $1:10^{-8}$, шляхом інкубації протягом 48 годин з додаванням сироватки крові ВРХ, щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконують таким чином.

З метою одержання стабільного штаму *Yersinia enterocolitica* серотип О:3 проводять його клонування. Для цього висівають дводобові суспензії культури на чашки Петрі з агаром Хотінгера у розведеннях від $1:10^{-1}$ до $1:10^{-10}$, інкубують за температури 28°C протягом 48 годин та отримують ізольовані колонії. На чашках Петрі з розведенням культури 10^{-1} , $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$, $1:10^{-6}$, $1:10^{-7}$, $1:10^{-8}$ спостерігався зливний ріст. З кожної чашки Петрі з розведенням 10^{-9} , 10^{-10} відбирають по два клони штаму та культивують на агарі Хотінгера за температури 28° протягом 48 годин. Після цього вивчають їх тинкторіальні, морфологічні, культуральні, біохімічні та антигенні властивості. В ході дослідження в окремих випадках спостерігають дисоціацію культур, які мають вигляд поліморфних клітин різної величини та характеризуються ростом гетерологічних колоній на агарі Хотінгера. З загальної кількості отриманих клонів були відібрані гомогенні культури, що мали однакові морфологічні ознаки: дрібні грамнегативні палички, які спор та капсул не утворювали.

На МПА та агарі Хотінгера формували дрібні, випуклі, хвилясті по колу, прозорі колонії, у прохідному світлі колонії мали світло-блакитний відтінок, на МПБ та бульйоні Хотінгера спостерігалася помірне помутніння бульйону та невеликий осад у вигляді "гудзика", який при струшуванні пробірки легко та рівномірно розбивався до однорідного стану. На напіврідкому МПА штам росте у вигляді білуватого кільця на поверхні середовища. На агарі Ендо росте у вигляді дрібних лактозонегативних прозорих колоній. На кров'яному агарі спостерігалися дрібні, округлі, хвилясті по колу, випуклі, прозорі, білувато-сірі колонії. Оптимальне рН середовища 7,2-7,4, оптимальна температура культивування $(28\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Може рости в діапазоні температур $4-40^{\circ}\text{C}$.

Біохімічні властивості. Штам утилізує глюкозу, маніт, арабінозу, манному, мальтозу, сахарозу, сорбіт та сечовину, має позитивну реакцію із метиловим червоним, каталазопозитивний. Штам не утворює H_2S та індол, не утилізує лактозу, рафінозу, рамнозу, дульцин, не росте на середовище з цитратом та ацетатом. Штам має негативну реакцію Фогеса-Проскауера, не має фенілаланіндезамінази.

Антигенні властивості отриманих клонів були типовими - суспензії живих культур давали позитивну реакцію на чотири плюси в реакції аглютинації на склі із гомологічними ієрсиніозними сироватками та негативну реакцію із гетерологічними та негативною контрольною ієрсиніозними сироватками.

Штам *Yersinia enterocolitica* серотип О:3 Л/134 було ідентифіковано та типовано в науково-дослідному інституті епідеміології та мікробіології ім. Л. Пастера у 1993 р. з групи культур ієрсиній, ізольованих від великої рогатої худоби (ВРХ). Штам належить до типу *Proteobacteria*, класу *GammaProteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, родини *Enterobacteriaceae*, роду *Yersinia*,

виду *Enterocolitica*, серотипу O:3. Штам виділено з лімфатичних вузлів ВРХ та зареєстровано в музеї лабораторії вивчення бруцельозу ННЦ "ІЕКВМ" (паспорт № 149). Штам депонований у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів та зберігається у депозитарії за номером № 758.

5 Приклад 1. Виготовлення гіперімунної специфічної сироватки крові на кролях. Для одержання бак маси штам *Yersinia enterocolitica* O:3 Л/134 висівали на МПА та вирощували за температури $(28 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Бактеріальну масу штаму змивали з поверхні агару стерильним фізіологічним розчином, стандартизували за оптичним стандартом каламутності до 2×10^9 КУО/см³ та інактивували на водяній бані за температури 100°C протягом 60 хв. Одержану суспензію охолоджували і центрифугували за 3000 об./хв. впродовж 20-25 хв. Надосадову рідину видаляли, а осад тричі відмивали стерильним фізрозчином за тих же умов центрифугування з додержанням правил асептики. Контролювали на повноту інактивації та стерильність за стандартними методиками.

15 Імунізацію 12 місячних кролів проводили внутрішньовенно чотири рази з інтервалом 4 доби в дозах 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 см³ в/в. Через 7 днів після останньої ін'єкції здійснювали відбір крові шляхом тотального знекровлення кролів. Сироватку консервували 5 % розчином фенолу, який малими порціями вносили в співвідношенні 1:10. Після відстоювання прозорий прошарок сироватки відбирали і фільтрували через стерилізуючий фільтр Зейтца та перевіряли на стерильність згідно з ДСТУ 4483. Активність та специфічність одержаної сироватки досліджували в РЗК з гомо- та гетерологічними ієрсиніозними антигенами. Результати досліджень зображено в табл. 1.

20 Як видно з даних табл. 1, отримана сироватка була активною (реакція в РЗК на ++++ в розведенні 1:80 та специфічною (позитивна реакція із гомологічним антигеном та негативна реакція із гетерологічними антигенами).

25 Приклад 2. Виготовлення ієрсиніозного антигена серотипу O:3 Л/134.

30 Штам *Yersinia enterocolitica* серотип O:3 Л/134 культивували на МПБ та інкубували за температури $(28 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ протягом 24 годин. Одержану бульйонну культуру перевіряли на чистоту фарбуванням мазків за Грамом, висівали на МПА та інкубували за температури $(28 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ протягом 48 годин. Після візуальної перевірки на чистоту росту культуру змивали стерильним фізіологічним розчином та стандартизували до концентрації 30×10^9 КУО/см³. До одержаного об'єму суспензії додавали 0,4-0,5 % фенолу та витримували 24 години за 37°C . Антигени перевіряли на повноту інактивації за стандартними методиками. Стерильність визначали згідно з ДСТУ 4483.

35 Активність та специфічність одержаного антигена перевіряли в РЗК із гомо- та гетерологічними сироватками. Результати досліджень відображено в табл. 2. Як видно з даних табл. 2, отриманий антиген був активний (реакція в РЗК на ++++ із гомологічною сироваткою в розведенні 1:20) та специфічний (позитивна реакція із гомологічною сироваткою та негативна реакція із гетерологічними та негативною сироватками).

40 Штам *Yersinia enterocolitica* серотип O:3 Л/134 є специфічним, стабільним та має високу антигенну та імуногенну активність. Він може бути застосований як виробничий штам для виготовлення вітчизняних тест-систем для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин.

Таблиця 1

Штам *Yersinia enterocolitica* IECVM серотип O:3 для виготовлення антигена та сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин

Ієрсиніозні антигени	Сироватка <i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:3						
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:3	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:5	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:6.30	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:8	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:9	-	-	-	-	-	-	-

Таблиця 2

Штам *Yersinia enterocolitica* IECVM серотип O:3 для
виготовлення антигена та сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин

Контрольні сироватки (розведення 1:20)	Антиген <i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:3
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:3	++++
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:5	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:6.30	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:8	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> серотип O:9	-

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання штаму *Yersinia enterocolitica* серотип O:3 Л/134 для виготовлення антигену та сироватки для серологічної діагностики ієрсиніозу тварин, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей культури *Yersinia enterocolitica*, який **відрізняється** тим, що клонують культуру *Yersinia enterocolitica* в розведенні від $1:10^{-1}$ до $1:10^{-8}$ для відбору поодиноких колоній та інкубують протягом 48 годин з додаванням сироватки крові ВРХ.
- 10