



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **26673** (13) **U**  
(51) **МПК (2006)**  
**A61K 39/00**  
**C12N 7/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ШТАМ *BACILLUS SUBTILIS* (КМИЭВ-39) ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ВІРУСОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

1

2

(21) u200610644

(22) 09.10.2006

(24) 10.10.2007

(72) КРАСОЧКО ПЕТР АЛЬБІНОВИЧ, КРАСОЧКО  
ІРИНА АЛЕКСАНДРОВНА, ВОЛОСЯНКО ОЛЕНА  
ВІКТОРІВНА, УА, ЄРЕМІЯ НІКОЛАЙ ГЕОРГІЄВИЧ

(73) КРАСОЧКО ПЕТР АЛЬБІНОВИЧ, ВОЛОСЯНКО  
ОЛЕНА ВІКТОРІВНА, УА

(56)

(57) Штам *Bacillus Subtilis* (КМИЭВ-39) для  
одержання вірусоспецифічних білків вірусу діареї  
великої рогатої худоби.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології й вірусології, зокрема до біотехнології й може бути використана для одержання вірусоспецифічних білків для конструювання діагностичних і профілактичних препаратів при вірусних інфекціях великої рогатої худоби (ВРХ).

Відомий мікроорганізм *Bac.subtilis*, що є ґрунтовим сапрофітом, виділюваним із зовнішнього середовища (1).

Однак в антигенній структурі його не містяться вірусоспецифічні білки і ділянки рибонуклеїнової кислоти (РНК), комплементарних вірусам тварин.

Відомі штамми вірусу діареї (ВД) ВРХ, що є джерелом вірусоспецифічних білків, які одержують шляхом культивування вірусів на культурі клітин (2).

Недоліком цього є складна технологія нагромадження вірусної маси, необхідність у культурі клітин, невеликий вихід вірусоспецифічного білка - до 1-3%, що значно здорожує вартість вакцинних і діагностичних препаратів.

Задача корисної моделі є одержання штаму бактерій, що має ділянки РНК, комплементарної ВД ВРХ й білки, антигенно-родинні ВД.

Поставлена задача досягається тим, що джерелом специфічних білків ВД ВРХ є штам бактерій *Bac. subtilis* (КМИЭВ-39), що має ділянки РНК, комплементарної ВД ВРХ й білки, антигенно-родинні цьому вірусу.

Приклад 1. Штам *Bac. subtilis* КМИЭВ-39 виділений з нормальних кормів тварин, задепонований і зберігається в Колекції Мікроорганізмів інституту експериментальної ветеринарії і йому привласнений номер КМИЭВ-39. Зберігання мікроорганізму здійснюється при +2

до +4°C. після ліофільного висушування в напіврідкому м'ясо-пептонному агарі (МПА) протягом 1-1,5 років. Життєздатність його підтримується шляхом передівання на м'ясо-пептонний агар 1 раз протягом 2-3 місяців за умови зберігання при +2 до +4°C.

Згідно класифікації мікроорганізмів по Бері *Bac.alvei* КМИЭВ-39 ставиться до другої морфологічної групи спороутворюючих аеробів, тому що бактеріальні клітини збільшують обсяг при спороутворюванні, суперечки еліпсоїдні, розташовані центрально. У зазначеній групі *Bac. subtilis* КМИЭВ-39 належить до підгрупи Б, у яку включені види, що не утворюють газ при ферментації вуглеводів. Досліджувана бацила являє собою велику паличку розміром 2-5x0,5-0,8мкм, вона грампозитивна, рухлива, помутніння на середовищі Китт-Тароцци, на кров'яному агарі - вологі слизові колонії з бахромою по краях, гемоліз, на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ). На щільних живильних (середовищах МПА) при температурі +37°C у аеробних умовах утворює сірий складчастий наліт. При культивуванні на МПБ помітна плівка, середовище прозора, на дні грудка вати, при струшуванні розбивається.

У біохімічному відношенні *Bac.subtilis* (КМИЭВ-39) слабо активний. Бактерії володіють каталазою активністю, не виділяє сірководень, дає негативну реакцію Фогес-Проксауера, не виділяють індол, руйнують сечовину, ферментує сахарозу, вабиль, глюкозу, орнітозу. Не ферментує арабінозу, сорбіт, рамнозу, інозит, ксилозу, лактозу.

Приклад 2. Наявність антигенів у бактерії, що перехресно-реагує з антигенами ВД ВРХ визначали шляхом постановки реакції аглютинації 11 штамів бацил з моноспецифічними

(13) U

(11) 26673

(19) UA

сироватками проти ВД. Постановку реакції здійснювали макрометодом у полістиролових панелях в обсязі 0,2мл. Як стандартні сироватки використані моноспецифічні сироватки з набору діагностиків ВД (виробництво Привольської біофабрики, Росія), набору діагностиків для Риф-зондів ВД (виробництво Інституту експериментальної й клінічної ветеринарної медицини УААН) (табл. 1).

Підтвердження наявності антигенів ВД в бактеріях підтверджували в ІФА з тест-системою для виявлення антигенів ВД в біологічному матеріалі [виробництво НПО «Нарвак», Росія].

У таблиці 1 представлені результати постановки РА 11 штамів бацил з моноспецифічними сироватками проти інфекційного ринотрахеїту (ІРТ) і ВД.

Отримані дані свідчать, що бактерії *Bac. Subtilis* БГУ 53 Б, *Bac. Subtilis* (КМІЭВ-39) і *Bac.antracoides* показали високу аглютинабельність до ВД. Підтвердженням специфічності даного явища з'явилася постановка імуноферментного аналізу зі стандартними діагностичними наборами для виявлення антигенів ВД в біологічному матеріалі. Дослідження проводилися в умовах діагностичної лабораторії Білоруського державного ветеринарного центру.

У таблиці 2 представлені результати постановки імуно-ферментний аналіз (ІФА) при виявленні антигенів ВД в бактеріях.

Таким чином, за результатами ІФА, антигени ВД встановлені в штамі *Bac.Subtilis* КМІЭВ-39.

Приклад 3. Для підтвердження наявності в структурі генома бацил ділянок РНК ВД використали ПЦР із праймерами, гомологічними для ділянки гена ВД.

Дослідження, проведені з використанням ПЦР показали, що в штамі *Bac.Subtilis* КМІЭВ-39 є ділянки РНК, комплементарні ВД Фіг.

При дослідженні для контролю використали ряд штамів *Bacillus* 100b(НИИП), *Bacillus* 200a (НИИП), *Bacillus* Білий НИИЭВ-2, *Bacillus Subtilis* Білий НИИЭВ, *Bacillus Subtilis* ВВИ-1, *Bacillus alvei* ВВИ - 1.

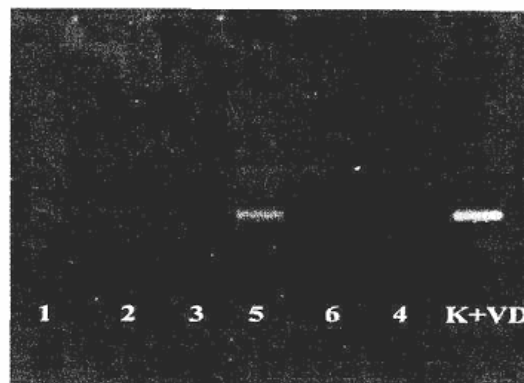
Джерела інформації

1. Каталог культур микроорганизмов института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН и Всероссийской коллекции микроорганизмов. Пушино - Москва, 1992. - С.33.

2. Жидков С.А. Вирусная диарея - болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (характеристика возбудителя, диагностика и специфическая профилактика): Автореф.дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03 / Всер. ин-т экс. ветеринарии. М, 1994. - 45с.

6	<i>Bac.alvei</i> ВВИ-Т	
7	<i>Bac. antracoides</i>	
8	<i>Bac. Subtilis</i> 945 (НИИП)	
9	<i>Bacillus</i> 100b (НИИП)	
10	<i>Bacillus</i> 200a (НИИП)	
11	<i>Bac.alvei</i> (КМІЭВ-11)	

№№ п/п	Штам
1	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ 53 Б
2	<i>Bac. Subtilis</i> КМІЭВ-39
3	<i>Bac. Subtilis</i> БелНИИЭВ-2
4	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ-2
5	<i>Bac.alvei</i> В-3
6	<i>Bac.alvei</i> ВВИ-1Т
7	<i>Bac.antracoides</i>
8	<i>Bac.Subtilis</i> 945 (НИИП)
9	<i>Bacillus</i> 100b (НИИП)
10	<i>Bacillus</i> 200a (НИИП)
11	<i>Bac.alvei</i> (КМІЭВ-11)



Фіг.1

Таблица 1

№№ п/п	Штам	Антисироватка до ВД (log2)
1	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ 53 Б	4,0
2	<i>Bac. Subtilis</i> КМІЭВ- 33	5,0
3	<i>Bac. Subtilis</i> БелНИИЭВ-2	3,0
4	<i>Bac. Subtilis</i> БГУ-2	2,0
5	<i>Bac.alvei</i> В-3	2,0