



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 3617

(13) U

(51) 7 A61K39/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ВИДОСПЕЦИФІЧНОЇ ЦИТРОБАКТЕРНОЇ АГЛЮТИНУЮЧОЇ СИРОВАТКИ

1

2

(21) 2004010009

(22) 08.01.2004

(24) 15.12.2004

(46) 15.12.2004, Бюл. № 12, 2004 р.

(72) Болдирев Андрій Дмитрович, Білявцева Олена Анатоліївна, Іонкіна Ірина Борисівна

(73) КРИМСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ІНСТИТУТУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб отримання видоспецифічної цитробактерної аглютинуючої сироватки шляхом імунізації специфічним імуногенним препаратом з наступним відбором крові та відокремленням сироватки, який відрізняється тим, що як специфічний імуногенний препарат тваринам-продуцентам багаторазово вводять інфраокулярно у однакових дозах через рівні проміжки часу суспензію штаму бактерій *Citrobacter* "Sp" (*C.freundii* Gallinarum) "INV", видоспецифічного за джерелом походження.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології, імунології, зокрема до способів отримання діагностичних сироваток та може бути використана у біотехнології при виробництві діагностичних сироваток, які входять до складу цитробактерних діагностиків. Застосування противірусних сироваток дозволить підвищити ефективність лабораторної діагностики цитробактерної інфекції, особливо у тих випадках, коли бактерії мають антигенні зв'язки з бактеріями роду *Salmonella*.

За даними медичної літератури окремі серологічні групи бактерій роду *Citrobacter* являються збудниками гострих кишкових інфекцій. Однак наявність рідства за біохімічними та антигенними властивостями бактерій *Citrobacter* і *Salmonella* може приводити до помилок при ідентифікації цих бактерій. Тому важливим являється визначення не тільки ферментативних властивостей, а й використання діагностичних специфічних сироваток для їх серологічної типізації. (М.Б. Лифшиц, 1973).

Першу антигенно-діагностичну схему бактерій роду *Citrobacter* (Bethesda-Ballerup E.frendii) запропонували West і Edwards у 1954 році. В теперішній час у бактерій роду *Citrobacter* описано 44 серологічних О-групи, 88 антигенів та більш 200 серологічних типів (В.П. Рагинская, 1973).

1. Антигенну структуру бактерій роду *Citrobacter* визначають за допомогою серологічного типування з полівалентними та типовими О-специфічними аглютинуючими сироватками. Виді-

лену культуру спочатку перевіряють із полівалентними, а потім з типовими сироватками в реакції аглютинації на склі. (В.П. Рагинская, М.Б. Лифшиц, 1973).

2. При диференціальній діагностиці антигенів *Salmonella* *tifimurium* і *Citrobacter* О 22 інфекції визначають не тільки О-антиген, а й Ні-антиген, який являється специфічним тільки для *Salmonella* *tifimurium* (Б.В. Каральних, Г.Г. Денисова, Л.Ш. Абдурахманова. 1991) при цьому використовують сорбовані імунореагенти, виготовлені з попередньо виділених антигенів: О-антигенні еритроцитарні діагностикми (ЕД); Ні - антигенний ЕД; антитільні ЕД. Застосовують також комерційні неадсорбовані сироватки проти *Salmonella* *parathify* В і *Salmonella* *tifimurium* виробництва Ташкентського інституту вакцин і сироваток.

Дослідження показали, що індикація Ні-антигену може використовуватися в якості диференціального критерію між цими інфекціями. Аналогічний підхід повинен використовуватися і в діагностиці захворювань методом приросту антитіл в динаміці.

3. У Росії Московським науково-дослідним інститутом вакцин і сироваток розроблено технологію отримання полівалентних О-сироваток, які містять аглютиніни до О-антигенів роду *Citrobacter*. Перелік позначень полівалентних О-сироваток виробництва Росії та вміст в них антитіл до окремих антигенів представлено у таблиці 1.

(13) U

(11) 3617

(19) UA

Таблиця 1

Полівалентні сироватки для бактерій роду *Citrobacter*

Групові сироватки	Аглютиніни до О-антигенів
1. Ci OA	1a, 1b, 1c, 2a, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 8a, 8c
2. Ci OB	9a, 3b, 10a, 10b, 11, 12a, 12b, 12c, 13, 14
3. Ci OC	7, 3b, 1c, 16, 17, 18, 19, 20
4. Ci OD	2, 1a, 21b, 22, 23, 24, 26
5. Ci OE	21a, 28, 29, 30, 31, 32
6 Ci OP	33, 34, 35, 36 37
7. Ci OG	38, 39, 40, 41, 42, 43, 44

Первісно культуру випробують із полівалентними О-сироватками, кожна з яких містить антитіла до антигенів ряду О-груп.

При позитивному результаті реакції аглютинації із однією з полівалентних сироваток далі продовжують серологічну ідентифікацію культур із сироватками до О-антигенів, які входять до складу полівалентної суміші, встановлюють належність штаму до серологічної О-групи.

Після встановлення О-групи визначають Н-антиген із використанням полі- та моновалентних Н-сироваток. Для визначення О- і Н-антигену в реакції аглютинації на склі використовують 18-24 годинну агарову культуру. (В.А.Килессо, 1985).

Прототип. Лабораторна діагностика кишкових захворювань, які викликані бактеріями роду *Citrobacter* повинна містити поряд із ідентифікацією соматичних антигенів, також визначення джгутикових антигенів (Рагинская В.П., Бутузова Л.П.). Було проведено експериментальне вивчення Н-антигенів бактерій роду *Citrobacter* та застосування їх для виготовлення Н-сироваток. У роботі використовували колекцію штамів роду *Citrobacter*, отриманих із США і Чехословачії.

Для підсилення та стабілізації рухливості культур штами вирощують у пробірках з 0,3% напірідким агаром при 37°C. Для більш інтенсивного розвитку Н-антигену послідовно проводять 6-8 пасажів.

Вакцину готують із 5-6 годинної бульйонної культури, яку вирощували при 37°C із додаванням 0,5% формаліну.

У якості продуцентів Н-сироваток використовують кролів вагою 2,5 кг (по 2 кролі на кожний штам).

Імунізацію проводять внутрішньовенно чотири-п'ять разів із 4-денним інтервалом між ін'єкціями у дозах 0,25; 0,5; 1,0 та 2,0 см³.

В сироватках визначають наявність Н-аглютининів до гомологічних культур у пробірочній реакції аглютинації.

У якості діагностикума використовують живі та формалінізовані 5-6 годинні бульйонні культури.

Встановлено, що формалінізовані бульйонні культури рухливих штамів *Citrobacter* не аглютинують О-сироватки і являються високочутливими діагностикумами для виявлення специфічних Н-аглютининів (Рагинская В.П., Л.П.Бутузова, 1973).

Треба відзначити, що на Україні не розроблено діагностичні сироватки для серологічної діагностики цитробактерної інфекції, а також для диференціальної діагностики харчових токсикоінфекцій з виділенням нетипових сальмонел.

Метою винаходу являється розробка способу отримання видоспецифічної цитробактерної аглюнінующої сироватки для ідентифікації мікроорганізмів роду *Citrobacter* і диференціації від *Salmonella*-інфекції.

Поставлена мета досягається шляхом імунізації курей/та 10 денних курчат бульйонною культурою штаму бактерій *Citrobacter* "Sp" (*C.Freundii Gallinarum*) "INV" (деклараційний патент на винахід №61253A UA від кл. А61К 39/10) із наступним знекровленням, та отриманням сироватки.

Спосіб приготування видоспецифічної цитробактерної аглюнінующої сироватки включає наступні етапи:

1. Підготовка штаму для імунізації. В роботі використовують штам бактерій *Citrobacter* "Sp" (*C.freundii gallinarum*) "INV", виділений нами від курей при порушенні функції яйцетворення та позитивно реагуючих з еритроцитарним пулорним антигеном (деклараційний патент на винахід №61253A UA від 17.11.2003, Кл. А61К 39/10).

Для підсилення росту та стабілізації штаму проводять посів із м'ясопептонного агару (МПА) та вирощують при 37°C. Через 24-48 годин із однієї колонії проводять посів на м'ясопептонний бульйон (МПБ) Проводять 2-3 послідовних пасажів.

Активність росту вважається задовільною, якщо через 16-18 годин інкубації спостерігають активний ріст культури.

2. Приготування імуногенного препарату.

У якості імуногенного препарату використовують 16-18 годинну живу бульйонну культуру *Citrobacter freundii*.

3. Тварини-продуценти діагностичної сироватки.

У якості продуцентів використовують дорослих курей 250-денного віку, та 10-денних курчат кросу Шевер 579, вільних від гомологічних антитіл. Було використано 10 курей та 15 курчат.

4. Схема імунізації. Імунізацію проводять шляхом інфраорбітального введення живої бульйонної культури *Citrobacter freundii* по 0,2см³ 3-х разів із інтервалом між ін'єкціями 3 доби. Кожна доза ін'єкції містить 2·10⁷ колонієутворюючих одиниць (КЮО). Повторно імунізацію проводять через 14 діб за тією ж схемою.

Птицю знекровлюють через 14 діб після останнього введення.

5. Визначення аглютиніну у сироватці.

В отриманих сироватках визначають наявність аглютининів до гомологічної культури *Citrobacter freundii* в пластинчатій реакції аглютинації із використанням мікротитратора Такачі.

6. Приготування антигену. Антиген для пластинчатої реакції аглютинації (РА) представляє собою завись добової бактеріальної культури *Citrobacter* "Sp", інактивованої 0,4% розчином формаліну. Концентрація бактерій за оптичним стандартом каламутності становить 20млрд/см³ (заявка на винахід №2003010207 від 08.01.2003).

7. Визначення активності і специфічності от-

риманих сироваток.

Активність і специфічність отриманої сироватки визначають в пластинчатій РА. Випробування проводять у тест-системі, яка містить: специфічну позитивну аглютинуючу сироватку; негативну сироватку від курей; фізіологічний розчин.

8. Порядок випробування.

Готують послідовні двократні розведення позитивної специфічної сироватки на фізіологічному розчині (рН 7,2) в об'ємі 0,05 см³. У всі розведення сироватки додають по 0,05 см³ робочого розчину антигену. Для отримання робочого розчину антигену нативний антиген розводять фізіологічним розчином 1:10).

В контролі випробують негативну сироватку

курей, та антиген із фізіологічним розчином на відсутність спонтанної аглютинації. Контролі повинні бути негативними.

Панель струшують та ставлять до термостату на 2 години при 37°C. Потім реакцію залишають при кімнатній температурі (23-25°C) протягом 20-22 годин.

8. Облік реакції.

Позитивна реакція характеризується наявністю парасольки на дні лунки.

Негативна реакція характеризується наявністю гудзика на дні лунки.

9. Результати випробування видоспецифічної цитробактерної аглютинуючої сироватки наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Випробування видоспецифічної цитробактерної аглютинуючої сироватки.

№	Інгредієнти	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	Видоспецифічна цитробактерна аглютинуюча сироватка	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Негативна сироватка	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	Фізіологічний розчин	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Найбільше розведення специфічної сироватки, при якому спостерігається чітка аглютинація вважають титром антитіл.

РА із специфічною сироваткою оцінюють позитивно при титрі 1:16 і вище.

Реакція із негативною сироваткою і фізіологічним розчином повинна бути негативною.

При отриманні сироватки із титром 1:16 і вище птицю знекровлюють із наступним відокремленням сироватки.

Джерела інформації:

1. Каральник Б.В., Т.Г.Денисова, Л.Ш. Абдурахманова, Ш.Н. Сарбасова, С.О. Кадиров. О серологической диагностике сальмонеллезов группы В // Лабораторное дело №7, Москва, Медицина - 1981, с.52-54.

2. Килесса. Род Citrobacter. В кн. Энтеробактерии (руководство для врачей). Авт. - И.В. Голубева, В.А. Килессо, Б.С. Киселева и др. Под ред. В.И. Покровского, - М.: Медицина, 1985, с.164-171, с.164-171.

3. Лифшиц М.Б. К характеристике свежевыделенных штаммов Citrobacter // Новые методы лабораторной диагностики и применение новых препаратов для диагностики кишечных инфекций:

Классификация шигел - Тезисы всесоюзного научно-практического семинара 28 мая-1 июня 1973г., М. 1973 - с.115-117.

4. Рагинская В.П. Антигенная структура и О-антигенные связи бактерий рода Citrobacter // Журнал микробиология, эпидемиология и иммунология - М. 1973, - №6, - с.78-83.

5. Рагинская В.П., Бутузова Л.П. методика приготовления диагностических Н-сывороток для идентификации бактерий рода Citrobacter // Сборник трудов. Вакцины и сыворотки. (Материалы по производству) Вып. 20, М. - 1973, с.89-91.

6. Рагинская В.П., Лифшиц М.Б. Методы идентификации бактерий рода Citrobacter и применение новых диагностических препаратов для их серологического типирования. - Новые методы лабораторной диагностики и применение новых препаратов для диагностики кишечных инфекций; классификация шигел. // Тезисы Всесоюзного научно-практического семинара 28 мая-1 июня 1973г. - М., 1973 - с.63-66.

7. West M.G., Edwards P.R. The Bethesda-Ballerup Group of paracolon Bacteria. - Washington. 1954.