



УКРАЇНА

(19) UA (11) 50366 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) МІКРООРГАНІЗМ *V. PARAHAEMOLYTICUS* ШТАМ № 23-2

1

2

(21) u200911053

(22) 02.11.2009

(24) 10.06.2010

(46) 10.06.2010, Бюл.№ 11, 2010 р.

(72) ГУРІНА ЛЮДМИЛА МИТРОФАНІВНА, КОЛЯДА МИКОЛА ІВАНОВИЧ, БОЛДИРЄВ АНДРІЙ ДМИТРОВИЧ, БОЛДИРЄВ ДМИТРО АНДРІЙОВИЧ
(73) КРИМСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ НАЦІОНАЛЬНОГО НАУКОВОГО ЦЕНТРУ "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"(57) Штам *V. parahaemolyticus* - продуцент бактерійного антигену, що використовують для серологічної діагностики захворювань, викликаних параземолітичними вібріонами у морських риб, який зберігається за номером № 23-2 у колекції мікроорганізмів лабораторії іхтіопатології та ветсанекспертизи морських риб та безхребетних Кримської дослідної станції Національного наукового центру "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини".

Корисна модель належить до біології, медичної та ветеринарної мікробіології і може бути використаний при виробництві біологічно активних препаратів: діагностичних параземолітичних антигенів, імунних сироваток, вакцин. Має загальнооретичне значення при вивченні міжвидових зв'язків штаму *V. parahaemolyticus* № 23-2 і штаму *V. parahaemolyticus* № 34-1, який знаходиться у колекції державної установи «Українська протичумна станція» МОЗ України.

У параземолітичних вібріонів описані три найбільш важливих типу антигенів. Н-антиген (жгутиковий): термолабільний, неспецифічний, зустрічається у всіх видів вібріонів. Показано, що флагелін, який получили з полярного жгутика *V. parahaemolyticus*, сумісний з іншими представниками роду *Vibrio*, у тому числі виду *V. alginolyticus* HS [1]. О-антиген (соматичний): термостабільний, витримує нагрівання до 100°C, не руйнується під дією спирту та соляної кислоти. К-антиген (поверхнево-капсульний) - термолабільний.

У основу серологічної ідентифікації галофільних вібріонів покладена різниця у будові О- і К-антигенів [2, 3]. Серологічне типування галофільних вібріонів має не тільки теоретичне, але і практичне значення, оскільки їх результати можуть бути використані для епідеміологічного та епізоотологічного аналізу захворюваності, викликаних цими мікробами.

Бактерії роду *Vibrio* складають самостійну групу родини *Vibrionaceae* (по *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 1994).

Бактерії *V. parahaemolyticus* широко розповсюджені у морських басейнах багатьох країн миру. Вони виявляються у морській воді, рибі, безхребетних та планктоні, але їх вивченню у Радянському Союзі не приділялось уваги. Згідно літературних даних *V. parahaemolyticus* можуть викликати як спорадичні випадки, так і спалахи захворювань у людей, які протікають по типу харчових токсикоінфекцій. Вони можуть виділятися як етіологічний агент при гастроентеритах, раневих інфекціях.

Ізольований нами штам, походженням від піленгасу, може бути використаний при виготовленні вакцин та діагностичних препаратів для риб.

Штам має наступні характеристики:

Культурально-морфологічні ознаки. Бактерії представляють собою грамнегативні, нерухомі палички, прямі або злегка вигнуті. Добре ростуть на поживних середовищах з вмістом хлориду натрію від 3 до 8%, оптимальна температура інкубації (35,0±2)°C з рН 7,8. Висіви інкубували в термостаті за температури (35,0±2)°C впродовж (2-5) діб з щоденним контролем характеру росту мікроорганізмів. На лужному агарі з 3% NaCl на основі морської води колонії галофільних вібріонів мають типову S- форму - опуклі, круглі, прозорі з рівним краєм, вологою блискучою поверхнею, блакитно-зеленкуватого кольору на аналогічному фоні. На агарі, що виготовлений на основі морської води, у *V. parahaemolyticus* виявлявся ефект «роїння».

(13) U
(11) 50366
(19) UA

На диференційному середовищі TCBS *V.parahaemolyticus* утворював колонії зеленого кольору. На селективному вібріоагарі рожеві колонії, що відповідає кольору середовища. Розміри колоній на агарі, виготовленому на морській воді через 18-24 години інкубування досягали 4-6мм в діаметрі.

На рідких середовищах вібріони викликали помутніння і утворення товстої поверхневої плівки.

Фізіолого-біохімічні характеристики. На середовищі Хью-Лейфсона *V.parahaemolyticus* розщеплював глюкозу за ферментативним та окислювальним типами. *V.parahaemolyticus* для виявлення

галофільних властивостей вирощували на середовищах з вмістом хлориду натрію 3% і 8%, при 10% і більше солі та при відсутності солі *V.parahaemolyticus* росту не давав. Для посіву на біохімічний ряд використовували 3-х годинну бульйонну культуру збудника.

На середовищі Реселя *V.parahaemolyticus* не розщеплював лактозу і сахарозу, не утворював газ. Парагемолітичні вібріони мали лізиндекарбоксилазу, не утворювали індол, не розщеплювали мочевины. На середовищі Кларка не утворювали ацетилметилкарбінол.

Таблиця

Основні тести для диференціації *V.parahaemolyticus* шт. № 23-2 від *V.parahaemolyticus* шт. № 34-1

Основні ознаки	<i>V.parahaemolyticus</i> № 23-2	<i>V.parahaemolyticus</i> № 34-1
Рухомість	-	-
Оксидаза	+	+
Утворювання індолу	-	-
Розщеплення глюкози:		
- окислювання	+к	+к
- ферментація	+к	+к
Ферментація:		
- сахарози	-	-
- манози	+к	+к
- маніту	-	+к
- шозіту	-	+к
- лактози	-	-
Зріст на середовищі з		
- NaCL - 3 %	+	+
- NaCL - 10 %	-	-
Утворювання дегідроксилази:		
- аргінін	-	-
- орнітин	-	+
- лізин	+	+
Гідроліз мочевины	-	-(+)
Аглютинація холерними сироватками (О1,Огава, Інаба та ін.)	-	-
Гемолітична активність	-	-
Чутливість до поліміксину	-	-

Умовні позначення:

+ - реакція позитивна в 90 % випадків

-(+) - рідко підтвержує результати

- негативна реакція

к - утворення кислоти

V.parahaemolyticus штам № 23-2 відрізняється від колекційного штаму

V.parahaemolyticus № 34-1 відсутністю ферментації маніту, інозиту та утворенням орнітиндекарбоксилази.

Вірулентність. Виявлено, що парагемолітичний вібріон продукує гемолізін - екзотоксин, який має ентеротоксичну та кардіотоксичну дію. Центрифугати одноденних культур, які вирощені на поживних середовищах, летальні для білих мишей при внутрібрюшинному введенні, що пов'язано з присутністю латеральних жгутиків.

Токсигенні (епідемічно і епізоотологічно значущі) варіанти, які містять ген гемолізіну, можуть спричинити масові випадки захворювання.

Нетоксигенні (що не містять ген гемолізіну) варіанти можуть викликати спорадичні або групові (при загальному джерелі інфікування) захворювання.

Спосіб отримання штаму та його ідентифікація. Матеріалом для бактеріологічного дослідження являється гомогенат із зябер, вмісту кишечника та м'язів. До посіву приступають як можна раніше, безпосередньо у секційного столу.

Матеріал інкубують за температурою 37°C впродовж 18 годин. Рожеві колонії, що утворилися

на селективному вібріоагарі заздалегідь ідентифікують як *V. parahaemolyticus* і здійснюють висіви на лактозосахарозне середовище, м'ясо-пептонний бульйон з 7% і 10% NaCl. Штами, які проявляють характерні зміни лактозосахарозного середовища, відсутність росту на м'ясо-пептонному бульйоні без NaCl і 10% NaCl, і наявність росту на живильному бульйоні з 7% NaCl, відносяться до *V. parahaemolyticus*.

Паралельно обов'язково роблять висів для виділення чистої культури і подальшої ідентифікації її за повною схемою.

При бактеріологічному дослідженні на галофільні вібриони використовують різні поживні середовища: транспортні середовища, рідкі середови-

ща, що збагачені 3 % NaCl, елективні диференціально-діагностичні середовища і набори середовищ для ідентифікації.

Матеріали, прийняті до уваги при експертизі

1. Shinoda S., Kaniyama B., Ogawa M., Iakeda Y., Miwatani T. Flagellan antigens of vibrios species of the genus *Vibrio* and related genera // Int.T. Syst. Bacteriol. - 1976. -V.26.- №2 - P.97-101.

2. Либинзон А.Е., Домина А.Л., Кулов Г.И. и др. Галофильные вибрионы, выделенные из Азовского моря // Ж. микробиол.- 1977.- № 6.- С.77-80.

3. Либинзон А.Е., Брудный Р.А., Нагорная А.Ф. и др. Галофильные вибрионы Черного моря и их роль в патологии человека // Ж. микробиол. - 1981. - № 2. -С.97-101.