



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53011 (13) A

(51) 7 A61K39/108, C12N1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІМУННИХ СИРОВАТОК ПРОТИ АНТИГЕНІВ ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ

1

2

(21) 2002010780

(22) 31 01 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Пархоменко Лариса Василівна, Грутман Марк  
Ісаакович, Паршиков Олександр Вікторович,  
Сопіль Ганна Володимирівна(73) Пархоменко Лариса Василівна, Грутман Марк  
Ісаакович, Паршиков Олександр Вікторович,  
Сопіль Ганна Володимирівна

(57) Спосіб одержання імунних сироваток проти антигенів грамнегативних бактерій, що включає виготовлення антигенного препарату, імунізацію продуцентів антигеном і виділення із крові цільового продукту, який відрізняється тим, що імунізацію проводять поверхневими антигенами в формі ліпосом із співвідношенням антиген-ліпідів 1:100 та вмістом імуномодуляторів 1 % глюкозамураміддипептиду і 0,5 % кверцетину

Винахід відноситься до області медицини, переважно до імунології інфекційних хвороб, і може використовуватись для діагностики, типування і визначення K, M, L - антигенів грамнегативних бактерій

Відомий спосіб (1) підвищення вмісту в сироватці крові антитіл проти антигену бактерій *Pseudomonas aeruginosa* шляхом щеплення вакциною з вмістом антигенів чотирьох серотипів псевдомонад. Вміст антитіл в сироватці крові щеплених тварин не перевищував титри 1:200 - 1:400. Крім того, одержана сироватка містить антитіла проти багаточисленних структурних антигенів бактерій, в тому числі внутрішніх, що знижує специфічність сироватки. Одержання і використання такої сироватки в імунологічних дослідженнях технічно і економічно не раціонально.

У відомому способі (2) для підвищення в сироватці крові антитіл проти сальмонел проводять щеплення телят бивалентною вакциною з вмістом інактивованих нативних бактерій *Salmonella dublin* і *Salmonella typhi* miltum, тому сироватка крові містить великий набір антитіл проти численних структурних антигенів і має не високу специфічність, а вміст антитіл в сироватці не завжди досягає захисного рівня, бо не забезпечує повного захисту тварин проти інфекційного захворювання.

Відомий спосіб (3) одержання ешерихіозної сироватки оснований на імунізації кроликів нативними бактеріями штаму *Escherichia coli* PCI. Штам являється моноплазмідним варіантом культури *E. coli* C600, одержаним шляхом генетичного схрещування двох різних штамів бактерій роду

*Escherichia coli*. Це ускладнює технологію одержання цільового продукту, а титри специфічних антитіл при імунізації рідко досягають значення 1:80.

В основу способу поставлене завдання створити простий спосіб одержання імунної сироватки проти грамнегативних бактерій з підвищеним вмістом антитіл високої специфічності, придатних для типування поверхневих K, M, L - антигенів.

Поставлене завдання вирішують шляхом виготовлення антигенного препарату із поверхневих K, M, L - антигенів грамнегативних бактерій, імунізацією ним продуцентів і виділення із крові цільового продукту - сироватки проти грамнегативних бактерій.

Для виготовлення поверхневого антигену грамнегативні бактерії вирощують протягом 3 діб загальноприйнятним методом (4). Змивають 0,15M розчином NaCl з вмістом 2% фенолу. Центрифугують годину при 5000 об/хв. Із надосадової рідини відомим методом (5) виділяють K - антигени і ліофільно висушують. До виготовленого антигену в ліпосомальній формі з співвідношенням антигену до ліпідів 1:100 додають 1% глюкозамураміддипептиду і 0,5% кверцетину в якості

імуномодуляторів. Одержаним препаратом імунізують продуцентів - кролів. Імунізацію проводять дворазове підшкірно дозою 0,5 і 1,0 мг антигену, через 30 діб проводять ревакцинацію шляхом підшкірного введення антигену в дозі 1,0 мг. Через 7 діб після ревакцинації із крові імунізованих кролів виділяють цільовий продукт - сироватку проти грамнегативних бактерій.

(13) A

(11) 53011

(19) UA

Приклад 1 Одержання імунної сироватки проти К - антигенів бактерій роду *Proteus*

Для цього одержують препарат з К - антигенів бактерій роду *Proteus*, імунізують ним кроликів і

виділяють сироватку В сироватці визначають титри антитіл Результати визначення приведені в таблиці 1

Таблиця 1

Титри антитіл у різні періоди після імунізації кроликів К - антигеном бактерій роду *Proteus*

	Після вакцинації	Після ревакцинації	Через місяць після ревакцинації
Титри	1 640	1 1280	1 640
протитіл	1 320	1 640	1 320
в РПГА	1 640	1 2560	1 1280
Середня геометрична титру	1 508	1 1280	1 640
$1/\log_2$ середньої геометричної титру	$8,99 \pm 0,27$	$10,32 \pm 0,47$	$9,32 \pm 0,47$

Таким чином, введення препарату поверхневого антигену стимулює вироблення в крові тварин високих титрів антитіл до поверхневих антигенів бактерій роду *Proteus* Антитіла у високих титрах з'являються в період імунізації і досягають максимуму після ревакцинації

Приклад 2 Одержання імунної сироватки проти L - антигенів бактерій роду *Escherichia*

Для цього виготовляють антигенний препарат

із поверхневих L - антигенів бактерій роду *Escherichia*, імунізують ним кролів В сироватці визначають титри антитіл Результати визначення приведені в таблиці 2

Приведені дані свідчать, що сироватка крові, одержана запропонованим способом містить високі титри антитіл проти антигенів бактерій роду *Escherichia*

Таблиця 2

Титри антитіл у різні періоди після імунізації кролів L - антигеном бактерій роду *Escherichia*

	Після вакцинації	Після ревакцинації	Через місяць після ревакцинації
Титри	1 640	1 1280	1 640
протитіл	1 320	1 640	1 320
В РПГА	1 640	1 1280	1 640
Середня геометрична титру	1 508	1 1016	1 508
$1/\log_2$ середньої геометричної титру	$8,98 \pm 0,27$	$9,98 \pm 0,27$	$8,99 \pm 0,27$

Приклад 3 Одержання імунної сироватки проти M - антигенів бактерій *Salmonella*

Для цього одержують препарат з M - антигенів бактерій *Salmonella*, імунізують ним кроликів і ви-

діляють сироватку В сироватці визначають титри антитіл Результати визначення приведені в таблиці 3

Таблиця 3

Титри антитіл у різні періоди після імунізації кроликів M - антигеном бактерій *Salmonella*

	Після вакцинації	Після ревакцинації	Через місяць після ревакцинації
Титри	1 640 1	1 1280	1 640
протитіл	1 320	1 640	1 1280
В РПГА	1280	1 2560	1 1280
Середня геометрична титру	1 640	1 1280	1 1016
$1/\log_2$ середньої геометричної титру	$9,32 \pm 0,47$	$10,32 \pm 0,47$	$9,98 \pm 0,27$

Таким чином, введення препарату поверхневого антигену стимулює вироблення в крові тварин високих титрів антитіл до поверхневих антигенів бактерій *Salmonella* Антитіла у високих титрах з'являються в період імунізації і досягають макси-

муму після ревакцинації

Приклад 4 Визначення ефективності способу Запропонованим і відомим способами одержують сироватки і визначають в них титри специфічних антитіл проти поверхневих антигенів грам-

негативних бактерій Результати визначення при-

ведені в таблиці 4

Таблиця 4

Титри антитіл проти грамнегативних бактерій в сироватці крові

Бактерії	Середнє геометричне титру анти- тіл в цільовому продукті	Титри антитіл в сироватці, одержаній відомим способом <sup>4</sup>
Proteus	1 1280	1 80
Salmonella	1 1016	1 80
Escherichia	1 1016	1 80
Pseudomonas	1 1280	1 160

Сироватки були отримані на 3 кролях до кожного роду бактерій шляхом імунізації їх за обома способами

Приведені в таблиці дані свідчать, що запропонований спосіб дозволяє одержати сироватку із високим вмістом специфічних антитіл проти грамнегативних бактерій, титр яких в 8 - 16 разів перевищує вміст антитіл в сироватці, одержаній відомим способом Крім того, запропонований спосіб для здійснення не потребує генетично синтезованих штамів, що спрощує його здійснення

#### Література

1 Ю Ф Борисович, Л В Кириллов Вакцина против псевдомоноза пушных зверей, преимущественно норок, способ ее получения и способ профилактики псевдомоноза пушных зверей, пре-

имущественно норок Патент Российской Федерации №1086074 від 23 07 82р

2 Ю А Малахов, Б Ю Шустер, В А Седов и др Вакцина против сальмонеллеза молодняка Авторское свидетельство №1197187 від 04 09 84р

3 Е И Попов, Э А Светоч, О А Тугаринов и др Способ получения эшерихиозной агглютинирующей K99 сыворотки Авторское свидетельство СССР №1412069 від 29 12 86р

4 W Nimmich Zur Isolierung und qualitativen Bausteinanalyse der K -Antigene von Klebsiellen, Z Med Mikrobiol Immunol, 1988, 154 117-131

5 Scott, J E Aliphatic Ammonium salts in the Assay of Acidic Polysaccharides from Tissues Methods Biochem Anal , 1960 8 145-197