



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63003 (13) U

(51) МПК

A61K 39/108 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕННОГО ЕШЕРИХІОЗНОГО ЕРИТРОЦИТАРНОГО ДІАГНОСТИКУМУ

1

2

(21) u201102056

(22) 21.02.2011

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) САВЧЕНКО БОРИС ІВАНОВИЧ, ЮРДАНОВА  
АЛЛА МИКОЛАЇВНА, СЛАВІНА НІНА ГЕОРГІЇВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "УКРАЇНСЬКИЙ НАУ-  
КОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ  
ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА"

(57) Спосіб одержання антигенного ешерихіозного  
еритроцитарного діагностикуму, що полягає у ест-  
ракції антигенів ешерихій, їх інактивації, сенсibili-  
зації еритроцитів та приготуванні діагностикуму,

який відрізняється тим, що виготовляють суспен-  
зію ентероінвазивного, високотоксигенного штаму  
кишкової палички 0151 "Крим", здійснюють дезін-  
теграцію замороженням-розмороженням, антиген  
екстрагують у вигляді поліпептидного комплексу  
гіпертонічним розчином хлористого натрію двічі,  
осаджують сульфатом амонію, проводять діалізу  
очистку одержаного продукту, висушують ліофілі-  
зацією, підготовляють еритроцити барана із засто-  
суванням розчину глюціну, після чого еритроци-  
ти сенсibiliзують формаліном, навантажують  
антигеном, витримують добу, визначають специ-  
фічну активність діагностикуму.

Корисна модель належить до медичної та ве-  
теринарної мікробіології та до біотехнології виго-  
товлення еритроцитарного діагностикуму.

Реакція пасивної гемаглютинації (РПГА) це  
метод визначення антигенів та антитіл, заснова-  
ний на здатності еритроцитів з адсорбованими на  
їхній поверхні антигенів або антитіл аглютинувати-  
ся в присутності гомологічних сироваток, або від-  
повідних антигенів. Наразі розроблені різні методи  
виготовлення еритроцитарних діагностикумів, від-  
мінних за способами виготовлення, що відрізня-  
ються способами сенсibiliзації еритроцитів (за  
допомогою таніну, глютарового альдегіду, хлорис-  
того хрому, риванолу та інш.) їх видової приналеж-  
ності (людини, барана, курей, індиків та інш.), ва-  
ріантами постановки реакцій (в планшетах для  
мікротитрування або в планшетах макротитруван-  
ня, пробірках та інш.) та врахуванням результатів  
(візуальний та інструментальний). Відомий ряд  
діагностичних антигенних еритроцитарних бакте-  
рійних діагностикумів, поміж яких еритроцитарні  
шигельозні; дизентерій 1,2; флекснера 1-5; флекс-  
нера 6 та Зонне, антигенні рідкі та сухі [1]; діагнос-  
тикуми сальмонельозні О-антигенні еритроцитарні  
[2]; дифтерійні еритроцитарні антигенні діагнос-  
тикуми [3], правцеві еритроцитарні антигенні діагнос-  
тикуми [4]; та значна кількість інших діагностику-  
мів.

Відомий патент №75823 Україна "Спосіб одер-  
жання імунної плазми проти грамнегативних бак-  
терій" [5]. У способі наведена методика одержання  
антигенного ешерихіозного еритроцитарного діа-  
гностикуму на основі комплексу поверхневих анти-  
генів грамнегативних бактерій родів *Proteus*,  
*Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia* а також  
*Staphylococcus aureus*. Препарат використовують  
для скринінгу плазми одноразових донорів. Недо-  
ліком діагностикуму є низькі титри антитіл у біль-  
шості зразків плазми 1:10-1:20, 1:40; (лише у 5  
зразках із 21 титри були від 1:640 до 1:2560 до  
*Escherichia*). Схожі результати були одержані до  
*Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. В даному випа-  
дку велика кількість нанесених антигенів на ери-  
троцити негативно відобразилася на якості препа-  
рату. Наведений препарат неможливо  
використовувати для діагностики інфекційних за-  
хворювань.

Як найближчий аналог вибрано спосіб одер-  
жання антигенного ешерихіозного діагностикуму  
[6]. Спосіб за винаходом ґрунтується на одержанні  
антигенного ешерихіозного еритроцитарного діа-  
гностикуму екстракцією адгезивного антигену із 7-  
ми культур ешерихій не визначних сероварів фо-  
сфатно-уреазним (сечовинним) буферним розчи-  
ном з рН 7,2÷7,4 при температурі +40÷45 °С після

(19) UA (11) 63003 (13) U

екстракції супернатант прогрівали при  $+65\div+68^{\circ}\text{C}$  та сумішшю цих антигенів проводили сенсibilізацію еритроцитів коня оброблених таніном та формаліном. Недоліком прототипу є застосування як антигену суміші адгезинів кишкових паличок невизначених сероварів, що не дає перспективи використання препарату для поглибленого визначення збудника інфекції при спалахах ентероколіту у людей та при розслідуванні епізоотії колібактеріозу серед птахів.

Поставлено задачу розробити спосіб одержання більш специфічного діагностичного, що давав би можливість ідентифікувати збудника інфекції виявленням антитіл у сироватках людей та птахів на ранніх стадіях захворювання, спричинених високوپатогенними ентероінвазивними кишковими паличками *E.coli* 0151 "Крим" [7,8], що мають епідемічне та епізоотичне розповсюдження.

Задача вирішувалась тим, що виготовляли суспензію ентероінвазивного, високотоксигенного штаму кишкової палички 0151 "Крим", здійснювали дезінтеграцію клітин замороженням-розмороженням. Антиген екстрагували у вигляді поліпептидного комплексу гіпертонічним розчином хлористого натрію двічі, осаджували сульфатом амонію. Після діалізної очистки одержаного продукту, висушували ліофілізацією. Окремо підготовляли еритроцити барана із застосуванням розчину глюціру, після чого еритроцити сенсibilізували формаліном та навантажували антигеном. Витримували добу, у термостаті, визначали специфічну активність діагностичному.

При вирішенні поставленої задачі (виготовлення антигену) враховували наступні підходи: вирощування бактеріальної маси, одержання поліпептидного комплексу, одержання еритроцитів барана та підвищення сенсibilізуючої активності еритроцитів, об'єднання поліпептидного комплексного антигену (сенситину) із сенсibilізованими еритроцитами.

Ешерихіозний антиген готують із ізольованого нами штаму ентероінвазивної кишкової палички *Escherichia coli* (EIEC) 0151 "Крим" біовар 2, що має всі характерні властивості для ентероінвазивних вірулентних штамів, викликає загибель білих мишей при внутрішньочеревному введенні 500 тис. мікробних клітин 18-годинної агарової культури. У штамі *Escherichia coli* (EIEC) 0151 "Крим" встановлено наявність 5 біотипів, що різняться за їх здатністю до утворення газу (також відсутність газоутворення у глюкозі), ферментацією арабінози, сорбіту, дульциту, декарбоксіліруванні лізину та орнітину. Штам *Escherichia coli* (EIEC) 0151 "Крим" біовар 2 має біохімічну активність характерну для 2-го біовару та має спільний O антиген з іншими 3 біоварами чітко аглютинуються специфічною діагностичною сироваткою в реакції аглютинації [7].

Поліпептидний комплекс одержують наступним чином. Нарощують бактеріальну масу на щільному середовищі та змивають фізіологічним розчином. Концентрують мікроорганізми центрифугуванням при 5000 об/хв. - 20-30 хв. Осад використовують для одержання антигену.

Бактеріальну масу заморожують при  $-80^{\circ}\text{C}$  та швидко розморожують. Екстрагують поліпептиди  $2,0\div2,5\%$  розчином хлориду натрію при  $+40\div+42^{\circ}\text{C}$  30-40 хв., центрифугують екстракт при 10000 об/хв. - 30 хв. для відділення надосадової рідини від осаду. До надосадової рідини додаємо сульфат амонію. Осад, що утворився, діалізуємо проти дистильованої води. Таким же чином обробляють осад бактеріальної маси повторно. Поліпептидні антигени, одержані при першій та другій обробці та після концентрації сульфатом амонію та діалізу проти дистильованої води, об'єднують в один антиген, ліофільно висушують, дозовану кількість розчиняють у фосфатнобуферному розчині перед нанесенням (навантаженням) на оброблені формаліном еритроцити барана. Проведення дезінтеграції бактеріальної маси шляхом глибокого заморожування з наступного екструзією реалізує оптимальні умови вивільнення антигенних комплексів та збереження їх нативності, що забезпечує підвищення специфічної активності антигенів. Дворазова екстракція осаду  $2,5\%$  розчином хлориду натрію та ізоляція другого супернатанту дозволяє підвищувати вихід поліпептидного комплексного антигену та зниження його собівартості. Антигени об'єднують в один препарат, стерилізацію здійснюють фільтрацією та ліофільно висушують. Фракціонування антигенів із супернатантів сульфатом амонію, крім ефекту концентрації та очистки, має одну важливу перевагу у порівнянні із іншими методами, а саме стабілізує білки; суспензія білкового осаду в 2-3 М розчині сульфату амонію стабільна впродовж багатьох років.

Порівняльне вивчення білкових фракцій кишкових бактерій, одержаних водносолювою екстракцією (NaCl) та ізольованих обробкою трихлороцтовою кислотою показало, що білкові фракції більш активні, ніж ліпополісахариди. Результати досліджень свідчать про те, що білкові компоненти бактеріальних клітин в більшості визначають їх серологічну специфічність та імунологічну активність [9, 10].

Кров для одержання еритроцитарної маси відбирають при промисловому забою тварин або у живих із яремної вени, в ємкості зі стерильним розчином глюціру [11]. Застосування розчину глюціру дозволяє зберігати еритроцити неушкодженими в 85-90 % без утворення грудочок, аутоаглютинатів. Еритроцити осаджують центрифугуванням при 3000 об/хв., відмивають стерильним фосфатно-буферним розчином від глюціру - 20 хв. при 2000 об/хв. Для підвищення чутливості еритроцити обробляють розчином формаліну [12]. Нанесення антигену - поліпептидного комплексу (сенситину) на еритроцити барана проводять наступним чином: осад еритроцитів розводять забуференим фізіологічним формальдегідом до 10 % концентрації, витримують добу при  $+37^{\circ}\text{C}$  та навантажують сенситин, витримують у термостаті 18-20 годин.

Фасують препарат у флакони ємкістю 10-12 мл та ліофільно висушують. Контролюють на активність, специфічність, визначають концентрацію еритроцитів та pH. Проводять ліофільне висушу-

вання та контролюють специфічну активність готового препарату.

Метод за його простотою та економічністю доцільно використовувати у промисловому виробництві.

Активність еритроцитарного антигену визначали в РНГА в полістиролових планшетах для мікротитрування із розведеною специфічною сироваткою, визначали активність діагностикуму за титрами антитіл у сироватці за допомогою стереоскопічного мікроскопа МБС-1 (реакція має бути позитивною до кінцевого титру діагностичної сироватки а також із сироватками перехворілих на ешерихіоз, спричинених *Escherichia coli* (EIEC) 0151 "Крим".

Специфічність визначали в РНГА із сироватками що мають антитіла до інших сероварів кишкових паличок сироватками з антитілами та з нормальними сироватками кролів (антигенний діагностикум не має вступати в реакцію з гетерологічними сироватками та аглютинуватися нормальною сироваткою кролів).

#### Приклад 1

Ешерихіозний антиген готують із штаму ентероінвазивної кишкової палички *Escherichia coli* (EIEC) 0151 "Крим" біовар 2. Бактеріальну масу нарощують на щільному середовищі, готують суспензію, змиваючи фізіологічним розчином. Концентрують мікроорганізми центрифугуванням при 5000 об/хв. 25 хв. Бактеріальну масу осаду заморожують при -80 °С, швидко розморожують. Екст-

рагують поліпептиди 2,5 % розчином хлориду натрію при +40 °С 35 хв. Екстракт центрифугують на 10000 об/хв. впродовж 30 хв. До надосадової рідини додають 2,5М розчин сульфату амонію. Осад діалізують проти дистильованої води. Таким же чином обробляють осад бактеріальної маси ще раз. Поліпептидні антигени, одержані за першої та другої обробки, об'єднують в один антиген, ліофілізують. Кров барана додають у ємкість із стерильним розчином глюціру. Еритроцити центрифугують на 3000 об/хв., відмивають стерильним фосфатно-буферним розчином від глюціру на 2000 об/хв. впродовж 20 хвилин. Одержані антигени розчиняють у фосфатно-буферному розчині. Осад еритроцитів розводять забуференим фізіологічним формальдегідом до 10 % концентрації, витримують добу при +37 °С та навантажують одержаний антиген. Витримують у термостаті 20 годин. Фасують препарат у флакони, ліофільно висушують. Проводять ліофільне висушування та контролюють специфічну активність готового препарату.

Одержаний антигенний еритроцитарний діагностикум на основі культури *E.coli* 0151 "Крим" перевіряли на 34 сироватках крові підлітків, що перехворіли на ентероколіт, спричинений *E.coli* 0151 "Крим". Визначали рівень М та G-антитіл в двох реакціях: в реакції аглютинації (РА) та РНГА з антигенним еритроцитарним діагностикумом *E.coli* 0151 "Крим". Результати наведені в Таблиці.

Таблиця

Серологічне обстеження хворих на ентероколіт

Кількість обстежених серологічним методом	Обстежені бактеріологічним методом	Ізольовані культури <i>E.coli</i> 0151 "Крим"	Не обстежені бактеріол. методом	Наявність М та G-антитіл		Максимальні титри антитіл	
				РА	РНГА	РА	РНГА
11	11	11		11	11	1:800	1:1600
23	-	-	23	13	23	1:400-1:800	1:1600
Всього 34	11	11	23	34	34	1:400-1:800	1:1600

Наведені в Таблиці результати свідчать про високу чутливість антигенного ешерихіозного діагностикуму на основі *E.coli* 0151 "Крим", можливість виявляти наявність специфічних антитіл у сироватках підлітків без проведення бактеріологічного обстеження (наявність G-антитіл свідчить про перенесене захворювання в осередку спалаху інфекції та про високу чутливість діагностикуму) та про можливість підтвердження захворювання на основі одержаних серологічних результатів.

#### Джерела інформації:

1. Инструкция по применению диагностикумов эритроцитарных шигеллезных; дизентерии 1,2; флекснера 1-5; флекснера 6 и зонне антигенных жидких и сухих. Утвержденная Министерством здравоохранения РСФСР от 24 февраля 1987 г., стр. 1-4.

2. Диагностикумы сальмонеллезные эритроцитарные 0- антигенные жидкие суспензия для диагностических целей.

3. Леви М. И., Кравцов Ф.Е., Басова Н.Н. МРТУ-4213-67 по изготовлению дифтерийного

эритроцитарного антигенного диагностикума. Утв. КВС МЗ СССР 05.03.1967.

4. Леви М. И., Фоменко Г.А., Басова Н.Н. МРТУ-4212-67 по изготовлению столбнячного эритроцитарного антигенного диагностикума 15-67. Утв. КВС МЗ СССР 05.03.1967.

5. Патент України №75823 "Спосіб одержання імунної плазми проти грамнегативних бактерій"

6. Патент RU №2353388 Способ получения антигенного эшерихиозного эритроцитарного диагностикума.

7. Савченко Б. І., Хабло З. А. Патент на корисну модель №43125 "Штам ентероінвазивної кишкової палички *Escherichia coli* 0151 "Крим" біовар 2 (EIEC) №818 для одержання діагностичної сироватки".

8. Савченко Б. І. Патент на корисну модель №46088 "Штам ентероінвазивної кишкової палички *Escherichia coli* 0151 "Крим" біовар 4 (EIEC) № 808 для одержання профілактичної вакцини".

9. Тимаков В. Д., Скавронская А. Г. Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии (ЖМЭИ).-1961. - N3. - С.3-9

10. Скоупс Р. Методы очистки белков. - М.: Мир, 1985, с 40.

11. Бощенко Ю. А., Савченко Б. І., Юрданова А. М., Маньковська Н. М Патент на корисну мо-

дель №6952 від 15.09.2004 г. Спосіб одержання еритроцитарної маси для приготування діагностичних препаратів.

12. Каральник Б. В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина, 1976, с 88; 105.