



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **98886**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 39/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 12783**

(22) Дата подання заявки: **28.11.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.05.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **12.05.2015, Бюл.№ 9**

(72) Винахідник(и):

**Стегній Борис Тимофійович (UA),
Орлов Сергій Миколайович (UA),
Обуховська Ольга Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) ШТАМ BRUCELLA ABORTUS 7-26 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ БРУЦЕЛЬОЗНОГО RS-АНТИГЕНУ

(57) Реферат:

Штам Brucella abortus 7-26 виділений і селекційований для виготовлення бруцельозного RS-антигену.

U
98886
UA

Корисна модель належить до біотехнології, зокрема до виготовлення виробничих штамів *Brucella abortus*, які використовують для виготовлення бруцельозного RS-антигену при дослідженні зразків клінічного матеріалу, щодо наявності антитіл до дисоційованих RS-форм бруцел у сироватці крові тварин.

Відомий штам *Brucella abortus* 82 в RS-формі (колекція Саратовської науково-дослідної ветеринарної станції, Російська Федерація), який використовують для виготовлення антигену зі штаму *B. abortus* 82 при диференційній діагностиці хворих на бруцельоз тварин від вакцинованих (Патент РФ № 2036473 G01N33/53, A61K38/10. - Опубл. 27.05.1995 р. - 2 с.). Також відомий комплексний діагностикум із суміші S- і R-антигенів бруцел в різних співвідношеннях, який використовують при постановці діагностичної реакції на бруцельоз (Патент РФ № 2203499 G01N33/569, A61K39/10. - Опубл. 27.04.2003 р. - 7 с.). Використання цих штамів в біологічній промисловості України неможливе за їх відсутністю. Для розробки препаратів для диференційної діагностики бруцельозу тварин необхідно мати вітчизняні виробничі штам.

В основу корисної моделі поставлено задачу винайти штам *Brucella abortus* в RS-формі для виготовлення антигену шляхом дослідження музейного вакцинного штаму *Brucella abortus* 7-26 з колекції культур бруцел. Штам *B. abortus* 7-26 був виділений і селекційований в УНДІЕВ у 1963 р., як інаглютинабельний мутант вірулентної культури *B. abortus*, ізольованої з аборт-плоду великої рогатої худоби. Відноситься до порядку *Proteobacteria*, класу *Alphaproteobacteria*, відділу *Rhizobiales*, родини *Brucellaceae*, роду *Brucella*, виду *Brucella abortus* і має стабільну RS-форму. Зареєстрований за № 57 штамів мікроорганізмів та зберігається в лабораторії вивчення бруцельозу Національного наукового центру «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини» НААН, м. Харків, Україна. Штам *B. abortus* 7-26, який знаходиться в RS-формі, має такі культурально-морфологічні, аглютинабельні та біохімічні властивості:

- росте на бруцельозних середовищах: м'ясо-печінковому пептонно-глюкозо-гліцеринному агарі (МППГГА) рН (7,2-7,4) та бульйоні (МППГГБ) в умовах термостату за температури (37,5±0,5) °C;

- у посівах на МППГГА росте у вигляді напівпрозорого нальоту; на агарі в бактеріологічних чашках на 3-4 добу формує круглі (від 0,5 до 2,0 мм в діаметрі), випуклі, зернисті колонії, сіро-блакитні з оранжево-жовтим центром, а після фарбування за Уайт-Вільсоном - фіолетові з червоним відтінком в центрі;

- на бульйоні - формує слабе помутніння й осад на дні пробірки;

- продукує сірководень;

- дає позитивну реакцію аглютинації з R- і S-бруцельозними сироватками, позитивні термофлюкацію (через 72 год.) й трипафлавінову пробу;

- дає ріст у напіврідкому агарі з фуксином (1:50000) і не росте на середовищі з тіоніном (1:25000);

- в мазках, що пофарбовані за Грамом, Козловським або Стемпом, штам має вид дрібних паличкоподібних (1,0-1,2 × 0,5-0,7) мкм бактерій рожевого та червоного кольору. Штам вільний від контамінації іншої бактеріальної мікрофлори та грибами. Підтримання штаму проводять шляхом пересіву з інтервалом 2-3 місяці на середовищі МППГГА рН (7,2-7,4) за температури (37,5±0,5) °C. Перевіряють культуру на культурально-морфологічні, аглютинабельні та біохімічні властивості не рідше одного разу за 6 місяців. Зберігають штам в пробірках на МППГГА під гумовими пробками або у ліофілізованому стані в ампулах в холодильнику за температури (4±2)° C. Корисну модель ілюструють наступні приклади.

Приклад 1. Проведено вивчення антигенних властивостей експериментальної серії бруцельозного RS-антигену, виготовленого зі штаму *B. abortus* 7-26, який знаходиться в RS-формі. Здійснили клонування штаму та вивчення властивостей отриманих 3-х клонів. Встановлено, що усі 3 клони культури росли на МППГГА у вигляді напівпрозорого нальоту і на бульйоні мали опалесценцію з аглютинатом на дні, утворювали H₂S, росли на МПНРА з фуксином (1:50000) і не росли на середовищі з тіоніном (1:25000), давали аглютинацію з S-бруцельозною і R-родовою бруцелаовісною сироватками, з трипафлавіном і в пробі термофлюкації (через 72 год). При мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом, Козловським та Стемпом, спостерігали дрібні паличкоподібні 1,0-1,2 × 0,5-0,7 мкм бактерії червоного та рожевого кольору. У посівах на МППГГА в чашці Петрі культури росли у вигляді круглих (від 0,5 до 2,0 мм в діаметрі), випуклих, зернистих колоній, які при бічному освітленні були сіро-блакитні з оранжево-жовтим центром, а після фарбування за Уайт-Вільсоном - мали фіолетовий колір з червоним відтінком в центрі. Однорідною вважали культуру, що мала не більше 5 % дисоційованих форм. Із відібраної культури з найбільш типовими властивостями виробляли RS-антиген. Далі культуру бруцел вирощували на матрацах з МППГГА протягом двох діб,

контролювали на типовість росту, відсутність контамінації, аглютинабельні властивості, а потім культуру змивали стерильним фізіологічним розчином натрію хлориду з додаванням 0,5 % фенолу рН (7,0-7,2), визначали концентрацію суспензії 100×10^9 КУО/см³ за стандартом каламутності та інактивували її у водяній бані за температури (80±1) °С протягом 60 хв., охолоджували за температури (18-20) °С й додатково витримували у холодильнику за температури (4±2) °С протягом 10 діб. Після інактивації бактерійної суспензії проводили контролювання повноти інактивації шляхом висіву на пробірки з МППГГА і МППГГБ, витримували їх у термостаті за температури (37,5±0,5) °С впродовж 7-10 діб. За відсутності специфічного росту суспензію вважали інактивованою. Потім інактивовану суспензію стандартизували стерильним фенолізованим фізіологічним розчином до концентрації 20×10^9 КУО/см³ (за бруцельозним стандартом каламутності), перевіряли на відсутність контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою шляхом висіву на середовища МПА, МПБ, Кітта-Тароцці, Сабуро і тіогліколеве середовище з резазурином згідно ДСТУ 4483. Суспензія була не контамінована бактеріальною та грибною мікрофлорою. Далі виготовлений бруцельозний RS-антиген фасували в стерильні флакони по 10,0 см³ й етикували їх.

Активність RS-антигену визначали у пробірочній реакції аглютинації відносно титрації робочих стандартів ННЦ «ІЕКВМ» (2012 р.) позитивної бруцельозної сироватки (S-сироватка), що містить 1000 МО в 1,0 см³, та позитивної ІЕ сироватки (R-бруцелаовісна сироватка). Визначення граничного титру антитіл проводили за стандартною методикою (згідно Настанови по діагностиці бруцельозу тварин, Київ, 1998 р.). Встановлено, що граничні титри бруцельозної сироватки становили 1:800 і R-бруцелаовісної сироватки - 1:50 на два хрести з бруцельозним RS-антигеном в робочому розведенні 1:10. В контролі застосовували антиген бруцельозний єдиний для РА, РЗК з шт. В. abortus 19 в S-формі (виробництво Херсонського державного підприємства - біологічної фабрики) у розведенні 1:10, титр якого з бруцельозною сироваткою становив 1:1000 і R-бруцелаовісною сироваткою реакція була негативною (табл. 1). На специфічність RS-антиген перевіряли з контрольними негативними сироватками крові великої рогатої худоби або овець з комерційних наборів (виробництва ТОВ «НДП «Ветеринарна медицина») титрі 1:25 і вище. Реакція була негативною. При контролюванні в РА самоаглютинуючих властивостей RS- антигену з фенолізованим фізіологічним розчином в рівному співвідношенні спостерігали негативну реакцію (рідина мутна, на дні пробірки осад бактерій у вигляді «пункту»).

Таким чином, бруцельозний RS-антиген, виготовлений з штаму В. abortus 7-26, є активним та специфічним і дозволяє виявити антитіла до дисоційованих RS-форм бруцел у сироватці крові тварин.

Приклад 2. Чутливість бруцельозного RS-антигену, який виготовлений за вищевказаною технологією, досліджували шляхом визначення граничного титру сироваток крові 36 морських свинок, інфікованих культурою вакцинного штаму В. abortus 7-26 після аплікації на слизову оболонку очей по $5,0 \times 10^7$ КУО і $4,0 \times 10^8$ КУО культури (по 18 голів на кожну дозу). Термін елімінації культури з організму тварин визначали через 16, 25, 49, 63, 87 і 102 діб після діагностичного забою 3-х морських свинок на дозу шляхом бактеріологічного дослідження патологічного матеріалу. Динаміку появи й згасання специфічних антитіл виявляли в РА з гомологічним бруцельозним RS-антигеном із штаму 7-26 та антигеном бруцельозним єдиним (S-форма) в розведенні 1:10. Результати досліді свідчать (табл. 2), що при серологічному дослідженні всі морські свинки незалежно від дози зараження реагували як на 16 добу в РА з гомологічним бруцельозним RS-антигеном із штаму В. abortus 7-26 в титрі - 1:40-1:80, на 63 добу - 1:160-1:320 і зниженням на 87 добу - 1:10-1:40. В ці ж строки тільки у 33,3-66,7 % тварин в РА з комерційним S-антигеном бруцельозним єдиним відзначали низький рівень антитіл 1:10-1:20. Слід відмітити, що у всіх морських свинок спостерігали на 63-87 добу позитивну реакцію з гомологічним бруцельозним RS-антигеном в порівнянні з негативною реакцією з бруцельозним S-антигеном. Згасання антитіл до RS-антигену спостерігали на 102 добу спостереження. Повну елімінацію культури з організму тварин спостерігали через 49 діб після вакцинації в обох групах.

Таким чином доведено, що у контактено заражених культурою В. abortus 7-26 морських свинок при відсутності негативної реакції в РА з бруцельозним S-антигеном спостерігали позитивну реакцію з гомологічним бруцельозним RS-антигеном.

Встановлено, що бруцельозний RS-антиген, виготовлений зі штаму В. abortus 7-26, виявляє високу чутливість при серологічному дослідженні щодо наявності антитіл до дисоційованих RS-форм бруцел у сироватці крові лабораторних тварин.

Приклад 3. В досліді на 18 морських свинок (2 дослідні та одна контрольна групи, по 6 голів у групі) вивчали імунологічну активність живої вакцини з штаму В. abortus 7-26 після разового введення. Дві групи морських свинок вакцинували живою культурою В. abortus 7-26 шляхом

аплікації на кон'юнктиву в дозі $5,0 \times 10^7$ КУО і підшкірно $25,0 \times 10^7$ КУО відповідно. Морським свинкам контрольної групи препарат не вводили. Гуморальну імунну відповідь у тварин вивчали через місяць при дослідженні в РА з бруцельозним RS-антигеном з штаму 7-26 та антигеном бруцельозним єдиним. За результатами досліджень встановлено, що через місяць після підшкірного введення живої вакцини зі штаму 7-26 в дозі $25,0 \times 10^7$ КУО у всіх морських свинок виявили більш виражену імунну реакцію в РА з гомологічним RS-антигеном - середньогометричний титр ($1,75 \pm 0,05$) Ig, ніж на кон'юнктивальне її введення в дозі $5,0 \times 10^7$ КУО - титр ($1,55 \pm 0,05$) Ig, $p < 0,1$ (табл. 3). В той же час, у 100 % морських свинок після щеплення спостерігали позитивну реакцію з RS-антигеном в більш високому титрі ніж при дослідженні з бруцельозним S-антигеном - 33,3-66,7 % тварин. При дослідженні в РА як з RS-антигеном, так і з антигеном бруцельозним єдиним сироватки морських свинок контрольної групи в титрі 1:10-1:20 були негативними.

Ці дані підтверджують, що бруцельозний RS-антиген, виготовлений зі штаму B. abortus 7-26, виявив високу специфічність та чутливість при серологічному дослідженні щодо наявності антитіл до RS-форм бруцел у сироватці крові тварин, які були заражені живою культурою B. abortus 7-26.

Приклад 4. В досліді на 10 баранах вивчали імунну відповідь на введення живої вакцини з шт. B. abortus 7-26. Баранам першої групи (5 голів) вводили підшкірно живу вакцину в дозі $5,0 \times 10^9$ КУО, контрольній групі (5 гол.) нічого не вводили. На 10, 45, 100, 135, 168, 190 добу після вакцинації проводили дослідження сироватки крові на бруцельоз в РБП з антигеном бруцельозним для роз-бенгал проби, РА та РЗК з антигеном бруцельозним єдиним (Херсонське державне підприємство - біологічна фабрика) і в РА з бруцельозним RS-антигеном (ННЦ «ІЕКВМ»). Визначення граничного титру антитіл проводили за стандартною методикою (Настанова по діагностиці бруцельозу тварин, К. 1998 р.).

При вивченні динаміки серологічних реакцій з бруцельозними антигенами встановлено, що у всіх баранів вакцинованих живою культурою зі штаму 7-26 виявили специфічні антитіла в РА, РБП і у 40 % тварин в РЗК на 10 добу після щеплення (табл. 4). Рівень антитіл у 80 % баранів на 45 добу в РА з гомологічним бруцельозним RS-антигеном був вище - титр ($1,08 \pm 0,07$) Ig, ніж з антигеном бруцельозним єдиним - 0,56 Ig ($p < 0,05$), який відмічали тільки у 40 % тварин даної групи. Аглютинуючі антитіла на 100 добу зберігалися у 60 % вакцинованих баранів в РА з RS-антигеном ніж при дослідженні в РА, РБП з S-антигеном - 40 % тварин, при цьому комплементзв'язуючі антитіла зникали. В подальшому на 135 добу РА з RS-антигеном була позитивною у 40 % тварин при негативних реакціях в РБП, РА і РЗК з бруцельозними S-антигенами. На 168, 190 добу після щеплення у баранів дослідної та повний термін дослідження у тварин контрольної груп сироватки в титрі 1:25-1:50 в РА з RS-антигеном, так і в РА, РЗК (титр 1:5-1:10) і РБП з бруцельозними S-антигенами були негативними.

Таким чином доведено, що бруцельозний RS-антиген, виготовлений з штаму B. abortus 7-26, можна застосовувати при дослідженні зразків клінічного матеріалу щодо наявності антитіл до дисоційованих RS-форм бруцел у сироватці крові тварин.

Приклад 5. Проведено вивчення чутливості та активності експериментальної серії бруцельозного RS-антигену в РА з польовими сироватками тварин з господарств. Застосовували сироватки тварин з сумнівними, хибнопозитивними та негативними результатами після серологічного дослідження на бруцельоз. Реакцію аглютинації проводили за стандартним способом з різними чотирма розведеннями сироватки (згідно «Настанови по діагностиці бруцельозу», К. 1998 р.). Діагностичним титром сироватки в РА з бруцельозним RS-антигеном вважали титр 1:100 для великої рогатої худоби і 1:50 для овець з оцінкою не менше як на 2 хрести. В якості контролю застосовували контрольні негативні сироватки, робочі стандарти позитивної бруцельозної сироватки та R-бруцелаовісної сироватки. В процесі проведення дослідження на бруцельоз в РБП 3293 тварин (3181 великої рогатої худоби, 112 овець різних вікових груп) з 7 областей України встановлено, що в 17,7 % випадках здійснювали уточнюючі серологічні дослідження. При повторних досліджень із використанням комерційного бруцельозного S-антигену виявили 1,54 % тварин із позитивними реакціями на бруцельоз. При проведенні уточнюючих досліджень із використанням експериментального бруцельозного RS-антигену та виробничого Yersinia enterocolitica 09 антигену встановлено, що 0,68 % хибнопозитивних реакцій на бруцельоз зумовлені серопозитивністю до ієрсиній. Реакцій зумовлених RS- та S-формами бруцел не виявлено.

Встановлено також, що граничні титри бруцельозної сироватки становили 1:800 і R-бруцелаовісної сироватки - 1:50 на два хрести з RS-антигеном в розведенні 1:10. Реакція RS-антигену в РА з контрольними негативними сироватками титрі 1:25 і вище була негативною. При

контролюванні в РА самоаглютинуючих властивостей RS-антигену з фенолізованим фізіологічним розчином в рівному співвідношенні спостерігали негативну реакцію.

Таким чином, штам B. abortus 7-26 в RS-формі може бути застосований для створення діагностикуму при проведенні скринінгових досліджень на бруцельоз.

5

Таблиця 1

Штам B. abortus 7-26 для виготовлення бруцельозного RS антигену

Сироватки	Титр								
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:600	1:800	1:1000	1:1200
Бруцельозний RS-антиген (1:10)									
Робочий стандарт ННЦ «ІЕКВМ» бруцельозної сироватки	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-
Робочий стандарт ННЦ «ІЕКВМ» R-бруцелаовісної сироватки	++++	++	+	-	-	-	-	-	-
Контроль 1									
Негативна контрольна сироватка ВРХ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Негативна контрольна сироватка овець	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,85 % розчин натрію хлориду	-								
5 % розчин натрію хлориду	-								
Контроль 2:	Антиген бруцельозний єдиний (1:10)								
Робочий стандарт ННЦ «ІЕКВМ» бруцельозної сироватки	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-
Робочий стандарт ННЦ «ІЕКВМ» R-бруцелаовісної сироватки	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Негативна контрольна сироватка ВРХ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Негативна контрольна сироватка овець	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,85 % розчин натрію хлориду	-								
5 % розчин натрію хлориду	-								

Таблиця 2

Штам B. abortus 7-26 для виготовлення бруцельозного RS антиген

Доза і спосіб введення культури	Термін забою (дів)	Серологічні дослідження на бруцельоз		Кількість тварин / із них заразилися
		РА (RS-антиген)*	РА (S-антиген)**	
		п/титр***	п/титр	
5,0×10 ⁷ КУО, кон'юнктивально	16	$\frac{3}{1:20 - 1:40}$	$\frac{1}{1:10}$	3/3
	25	$\frac{3}{1:40}$	$\frac{1}{1:10}$	3/3
	49	$\frac{3}{1:320}$	$\frac{1}{1:10}$	3/-
	63	$\frac{3}{1:160 - 1:320}$	$\frac{1}{1:10}$	3/-
	87	$\frac{3}{1:10 - 1:20}$	-	3/-
	102	-	-	3/-
4,0×10 ⁸ КУО, кон'юнктивально	16	$\frac{3}{1:40 - 1:80}$	$\frac{2}{1:10}$	3/3
	25	$\frac{3}{1:80}$	$\frac{2}{1:10}$	3/3
	49	$\frac{3}{1:320}$	$\frac{1}{1:20}$	3/-
	63	$\frac{3}{1:160 - 1:320}$	-	3/-
	87	$\frac{3}{1:10 - 1:20}$	-	3/-
	102	-	-	3/-

Примітки: * - РА з бруцельозним RS-антигеном (шт. B. abortus 7-26);
 ** - РА з антигеном бруцельозним єдиним;
 *** - п - кількість реагуючих (чисельник), титр (знаменник).

Таблиця 3

Штам B. abortus 7-26 для виготовлення бруцельозного RS антигену

Група	Вакцина і спосіб введення	Доза вакцини (КУО)	Імунна відповідь після вакцинації	
			РА (RS-антиген)*	РА (S-антиген)**
			титр Іg *** кількість тварин, %	титр Іg кількість тварин, %
1	жива, кон'юнктивально	5,0×10 ⁷	$\frac{1,55 \pm 0,05}{100,0}$	$\frac{0,33}{33,3}$
2	жива, підшкірно	25,0×10 ⁷	$\frac{1,75 \pm 0,05}{100,0}$	$\frac{1,07 \pm 0,07}{66,7}$
3 контроль	-	-	-	-

Примітки:
 * - РА з бруцельозним RS- з антигеном (шт. B. abortus 7-26);
 ** - РА з антигеном бруцельозним єдиним;

*** - середньогометричний титр $M \pm m \lg$.

Таблиця 4

Група, вакцина	Термін (діб)	Бруцельозна серопозитивність після вакцинації			
		RS-антиген	S-антиген		
		РА	НФ	РЗК	РБП
		$\frac{n, \%}{\text{титр } \lg}$	$\frac{n, \%}{\text{титр } \lg}$	$\frac{n, \%}{\text{титр } \lg}$	n, %
1, жива	10	$\frac{100,0}{1,83 \pm 0,16}$	$\frac{100,0}{1,72 \pm 0,11}$	$\frac{40,0}{0,34}$	100,0
	45	$\frac{80,0}{1,08 \pm 0,07}$	$\frac{40,0}{0,56}$	$\frac{40,0}{0,28}$	100,0
	100	$\frac{60,0}{0,62 \pm 0,07}$	$\frac{40,0}{0,56}$	-	40,0
	135	$\frac{40,0}{0,56}$	-	-	-
	168	-	-	-	-
	190	-	-	-	-
2, контроль	10	-	-	-	-
	45	-	-	-	-
	100	-	-	-	-
	135	-	-	-	-
	168	-	-	-	-
	190	-	-	-	-

Примітка: *- n - кількість реагуючих, % (чисельник), середньогометричний титр $M \pm m \lg$ (знаменник).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Штам *Brucella abortus* 7-26 виділений і селекційований для виготовлення бруцельозного RS-антигену.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601