



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005121699/13, 12.07.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
12.07.2005

(45) Опубликовано: 27.03.2007 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: SU 1268172 A1, 07.11.1986. CN 1595155,  
16.03.2005.

Адрес для переписки:

107140, Москва, ул. В. Красносельская, 17,  
ВНИРО, патентный отдел, Т.В. Шульгиной

(72) Автор(ы):

Бондаренко Виктор Зиновьевич (RU),  
Безгачина Татьяна Владимировна (RU),  
Мельник Николай Васильевич (RU),  
Шумилов Константин Васильевич (RU),  
Скляр Оleg Дмитриевич (RU),  
Апалькин Виктор Александрович (RU),  
Литвинов Олег Борисович (RU),  
Елесеев Анатолий Константинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное  
предприятие Всероссийский научно-  
исследовательский институт рыбного хозяйства  
и океанографии (ФГУП ВНИРО) (RU)(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЭРИТРОЦИТАРНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ  
ВИБРИОЗА РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и  
рыбоводству. Предложен способ изготовления  
эритроцитарного антигена для диагностики  
вibriоза рыб. Способ предусматривает  
приготовление питательных сред, посевного  
материала и получение сенситина из штаммов  
*Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19, с последующей

сенсбилизацией эритроцитов барана. При этом  
используют 20% взвесь формализированных  
эритроцитов на фосфатно-буферном растворе с pH  
7,0-7,4. Сенсбилизацию проводят на водяной бане  
в два этапа. Эритроциты и сенситин берут в  
соотношении 1:0,3-1:0,35. Изобретение может быть  
использовано в рыбоводстве.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 295 974** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.

**A61K 39/02** (2006.01)

**G01N 33/556** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005121699/13, 12.07.2005**

(24) Effective date for property rights: **12.07.2005**

(45) Date of publication: **27.03.2007 Bull. 9**

Mail address:

**107140, Moskva, ul. V. Krasnosel'skaja, 17,  
VNIRO, patentnyj otdel, T.V. Shul'ginov**

(72) Inventor(s):

**Bondarenko Viktor Zinov'evich (RU),  
Bezgachina Tat'jana Vladimirovna (RU),  
Mel'nik Nikolaj Vasil'evich (RU),  
Shumilov Konstantin Vasil'evich (RU),  
Skljarov Oleg Dmitrievich (RU),  
Apal'kin Viktor Aleksandrovich (RU),  
Litvinov Oleg Borisovich (RU),  
Eleseev Anatolij Konstantinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe  
predpriatie Vserossijskij nauchno-  
issledovatel'skij institut rybnogo  
khozjajstva i okeanografii (FGUP VNIRO) (RU)**

(54) **METHOD FOR PRODUCING ERYTHROCYTIC ANTIGEN FOR PREDICTING VIBRIOSIS IN FISH**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, pisciculture.

SUBSTANCE: the innovation deals with preparing nutritive media, inoculation material and obtaining sensitin out of the strains *Vibrio anguillarum* N2 and VUR-19 followed by sensitization of ram's erythrocytes. Moreover, it is necessary to apply 20%-suspension of

formalinized erythrocytes upon phosphate-buffer solution at pH being 7.0-7.4. Sensitization should be carried out upon water bath in two stages. Erythrocytes and sensitin should be taken at the ratio of 1:0.3-1:0.35.

EFFECT: higher efficiency.

2 ex

RU 2 2 9 5 9 7 4 C 1

RU 2 2 9 5 9 7 4 C 1

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к рыбоводству, к способам получения эритроцитарного антигена для диагностики вибриоза рыб.

Вибриоз рыб это опасное бактериальное заболевание. Встречается у 42 видов рыб и гидробионтов в 16 странах мира в солоноватой, морской и пресной воде. Клиническими признаками заболевания являются покраснение кожных покровов, ерошение чешуи, язвы на поверхности тела рыбы, воспаление анального отверстия. При патологоанатомическом вскрытии наблюдаются наличие гнойного экссудата в полости тела рыбы, увеличение и потемнение почек, точечные кровоизлияния в печени. Это заболевание имеет несколько форм течения, от хронического - с покраснением участков наружных покровов и образованием язв на поверхности тела, до острого септического - характеризующегося внезапной гибелью рыб без внешних признаков поражения. В настоящее время отсутствует специфическая профилактика заболевания, а борьба сводится к организационно-хозяйственным и ветеринарно-санитарным мероприятиям.

Технической задачей заявленного изобретения является получение антигена, предназначенного для диагностики вибриоза рыб.

Поставленная задача достигается в способе изготовления эритроцитарного антигена для диагностики вибриоза рыб, включающем приготовление питательных сред, посевного материала, получение сенситина из штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19, с последующей сенсibiliзацией эритроцитов барана, при этом используют 20% взвесь формализированных эритроцитов на фосфатно-буферном растворе с pH 7,0-7,4, сенсibiliзацию проводят на водяной бане в два этапа, на первом - в течение 60-65 мин при температуре 55-60°C, а на втором - в течение 120-130 мин при температуре 40-42°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,3-1:0,35, антиген расфасовывают во флаконы по 10-20 см<sup>3</sup>.

Полученный антиген представляет собой жидкость коричневого цвета, которая при хранении расслаивается на прозрачную часть и темно-коричневый осадок. Антиген должен давать четкую положительную реакцию с гомологичной сывороткой и не давать реакцию с гетерологичными сыворотками и физраствором.

Срок годности антигена 18 мес при условии хранения в темном сухом помещении при температуре 4-8°C.

Использование разработанного антигена позволяет своевременно диагностировать вибриоз рыб и успешно бороться с этим заболеванием.

Способ осуществляют следующим образом.

Основные стадии технологического процесса.

Подготовка основного сырья включает приготовление перевара Хоттингера, мясопептонного агара и затем приготовление питательных сред. Готовая питательная среда стерильна, прозрачна, pH 7,4-7,8 и содержит 160-180 мг% аминного азота.

Приготовление посевного материала включает выращивание культур штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 вначале на пробирках с МПА, затем на производственной питательной среде во флаконах емкостью 200-300 см<sup>3</sup>. Получение матровой расплодки 1-го пассажа: сухие штаммы, полученные из ВГНКИ, ресуспендируют путем внесения в ампулы по 1,0-1,5 мл стерильного МПБ и методом капельного орошения высевая на пробирки с МПА, затем их оставляют на 2-е суток в темном месте при температуре 18-25°C. Затем проводят аналогично получение матровых расплодок 2-го и 3-го пассажа.

По окончании культивирования бакмассу охлаждают и подают на центрифугирование, а затем гомогенизируют в течение 5-6 мин.

Процесс получения сенситина осуществляют путем отделения бакмассы от питательной среды, экстракции антигенов с помощью, например, раствора ледяной уксусной кислоты, отделения экстракта от взвеси микробных клеток и дейтрита на суперцентрифуге, концентрирования антигенов, отделения осадка и приготовления раствора сенситина в оптимальной концентрации для сенсibiliзации эритроцитов.

Кровь берут из яремной вены баранов-доноров с последующим получением эритроцитов. Из осадка отмытых эритроцитов готовят 20% взвесь формализированных

эритроцитов на фосфатно-буферном растворе с pH 7,0-7,4, а сенсibilизацию эритроцитов проводят на водяной бане в два этапа, на первом - в течение 60-65 мин при температуре 55-60°C, а на втором - в течение 120-130 мин при температуре 40-42°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,3-1:0,35. Антиген расфасовывают во флаконы по 10-20 см<sup>3</sup>.

Пример 1.

Для получения эритроцитарного антигена для диагностики вибриоза рыб готовят питательную среду с pH 7,4 и содержанием 160 мг% аминного азота.

Посевной материал готовят путем выращивания культур штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 вначале на пробирках с МПА, затем на производственной питательной среде во флаконах емкостью 300 см<sup>3</sup>. Затем получают матровые расплодки 1-го, 2-го и 3-го пассажа.

По окончании культивирования бакмассу охлаждают и подают на центрифугирование, а затем гомогенизируют в течение 5 мин.

Сенситин получают в процессе отделения бакмассы от питательной среды, экстракции антигенов с помощью, например, раствора ледяной уксусной кислоты, отделения экстракта от взвеси микробных клеток и дейтрита на суперцентрифуге, концентрирования антигенов, отделения осадка и приготовления раствора сенситина в оптимальной концентрации для сенсibilизации эритроцитов.

Кровь берут из яремной вены баранов-доноров с последующим получением эритроцитов. Из осадка отмытых эритроцитов готовят 20% взвесь формализированных эритроцитов на фосфатно-буферном растворе с pH 7,0, а сенсibilизацию эритроцитов проводят на водяной бане в два этапа, на первом - в течение 60 мин при температуре 60°C, а на втором - в течение 130 мин при температуре 40°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,3. Антиген расфасовывают во флаконы по 10 см<sup>3</sup>.

Пример 2.

Проводят аналогично примеру 1, а исключением является то, что сенсibilизацию эритроцитов проводят на водяной бане в два этапа, на первом - в течение 65 мин при температуре 55°C, а на втором - в течение 120 мин при температуре 42°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,35. Антиген расфасовывают во флаконы по 20 см<sup>3</sup>.

Пример 3.

Проводят аналогично примеру 1, а исключением является то, что сенсibilизацию эритроцитов проводят на водяной бане в два этапа, на первом - в течение 60 мин при температуре 55°C, а на втором - в течение 125 мин при температуре 41°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,35. Антиген расфасовывают во флаконы по 20 см<sup>3</sup>.

#### Формула изобретения

Способ изготовления эритроцитарного антигена для диагностики вибриоза рыб, включающий приготовление питательных сред, посевного материала, получение сенситина из штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19, с последующей сенсibilизацией эритроцитов барана, при этом используют 20% взвесь формализированных эритроцитов на фосфатно-буферном растворе с pH 7,0-7,4, сенсibilизацию проводят на водяной бане в два этапа, на первом в течение 60-65 мин при температуре 55-60°C, а на втором - в течение 120-130 мин при температуре 40-42°C, причем эритроциты и сенситин берут в соотношении 1:0,3-1:0,35, антиген расфасовывают во флаконы по 10-20 см<sup>3</sup>.