



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2015105590/15, 19.02.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.02.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.02.2015

(45) Опубликовано: 27.08.2016 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: I. SHCHELKUNOV et al., Further virus characterization, diagnostics and prevention of Siberian sturgeon herpesvirus disease. USA-Russia Bilateral Workshop On Aquaculture and FishHealth USGS Western Fisheries Research Center, Seattle, WA, USA October, 2012, PP. 1-5. RU 2385941 C1, 10.04.2010. DE10124342 A1, 28.11.2002. J.T.LEJEUNE, F.R.RURANGIRWA. (см. прод.)

Адрес для переписки:

109428, Москва, Рязанский пр-кт, 24, корп. 1,
ФГБНУ ВИЭВ

(72) Автор(ы):

Дрошнев Алексей Евгеньевич (RU),
Завьялова Елена Александровна (RU),
Богданова Полина Дмитриевна (RU),
Гулюкин Михаил Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.
Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ) (RU)

(54) СПОСОБ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЙЕРСИНИОЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ, ВЫЗЫВАЕМОГО *Yersinia ruckeri*, МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ СПОСОБА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области ветеринарной биотехнологии, микробиологии и может быть использована для выявления антигена возбудителя йерсиниоза лососевых - *Yersinia ruckeri* в биологическом материале как для диагностики болезней рыб в ветеринарии, так и для научных исследований методом иммуноферментного анализа. Сущность группы изобретений состоит в использовании диагностического набора, включающего все необходимые компоненты для проведения иммуноферментного анализа, позволяющего выявлять антиген *Yersinia ruckeri* в образцах биологического материала от рыб на ранней стадии развития болезни с высокой

специфичностью и чувствительностью. Группа изобретений относится также к способу серологической диагностики йерсиниоза лососевых рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri*, подразумевающему применение специфичных анти-ERM-антител, необходимых для детектирования антигена ERM, а после инкубации и последующее отмывание, при котором используют специфичный иммуноферментный конъюгат, представляющий собой анти-ERM-антитела, меченные пероксидазой хрена. Группа изобретений обеспечивает чувствительную и эффективную серодиагностику йерсиниоза рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri* на ранних этапах развития болезни. 2 н.п. ф-лы, 2 пр.

(56) (продолжение):

Polimerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J.Vet.Diagn.Invest., 2000, 12, PP.558-561. KOTETISHVILI M. et al. Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species, J Clin Microbiol., 2005, v.43, no.6, p. 2674-2684.

R U 2 5 9 5 8 8 3 C 1

R U 2 5 9 5 8 8 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2015105590/15, 19.02.2015**(24) Effective date for property rights:
19.02.2015

Priority:

(22) Date of filing: **19.02.2015**(45) Date of publication: **27.08.2016** Bull. № 24

Mail address:

**109428, Moskva, Rjazanskij pr-kt, 24, korp. 1,
FGBNU VIEV**

(72) Inventor(s):

**Droshnev Aleksej Evgenevich (RU),
Zavyalova Elena Aleksandrovna (RU),
Bogdanova Polina Dmitrievna (RU),
Gulyukin Mikhail Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij nauchno-
issledovatel'skij institut eksperimentalnoj
veterinarij imeni YA.R. Kovalenko (FGBNU
VIEV) (RU)**(54) **METHOD FOR SERUM DIAGNOSIS OF SALMON FISH YERSINIOSIS CAUSED BY *Yersinia ruckeri* BY ENZYME IMMUNOASSAY AND DIAGNOSTIC SET FOR IMPLEMENTING METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to veterinary biotechnology, microbiology and can be used for detection of antigen of causative agent of salmon yersiniosis - *Yersinia ruckeri* in biological material for diagnosis of diseases in veterinary science, and for scientific research by enzyme immunoassay. Essence of group of inventions consists in using a diagnostic kit, including all necessary components for enzyme immunoassay, enabling detection of antigen of *Yersinia ruckeri* in biological material samples of fish at early stage of development of disease with high specificity

and sensitivity. Group of inventions also relates to a method of serum diagnosis of salmon yersiniosis caused by *Yersinia ruckeri*, which involves use specific anti-ERM-antibodies, required for detection of antigen ERM, and after incubation and further washing, which uses specific immunoenzymometric conjugate, which is an anti-ERM antibodies, labelled with horseradish peroxidase.

EFFECT: group of inventions provides sensitive and effective serum diagnosis of fish yersiniosis, caused by *Yersinia ruckeri* at early stages of disease.

2 cl, 2 ex

Предлагаемое изобретение относится к области ветеринарной биотехнологии, микробиологии и может быть использовано для выявления антигена возбудителя йерсиниоза лососевых - *Yersinia ruckeri* в биологическом материале как для диагностики болезней рыб в ветеринарии, так и для научных исследований методом

5 иммуноферментного анализа.

Рыбоводство, как основное направление современной аквакультуры России - важнейшая отрасль сельского хозяйства. Рыбы при интенсивном выращивании постоянно контактируют с огромным количеством микроорганизмов как непатогенных, так и патогенных, представляющих опасность в развитии эпизоотий. Одна из таких -

10 *Yersinia ruckeri*, бактерия семейства Enterobacteriaceae, которая вызывает кишечную болезнь йерсиниоз - Enteric Red Mouth (ERM), известную также под названием «красный рот», хроническую системную инфекцию радужной форели, выращиваемой в пресной воде. За рубежом, в регионах, активно занимающихся форелеводством, йерсиниоз

15 считается опасной инфекцией. Болезнь наносит существенный урон рыболовческим хозяйствам, приводит к высокому уровню гибели рыбы и к порче ее товарного вида.

В первую очередь заболеванию подвержены разные виды лососевых и сиговых рыб, также известны случаи выявления возбудителя у других пресноводных гидробионтов, что служит вектором передачи бактерий в окружающей среде культивируемой рыбе. *Y. ruckeri* передается горизонтально, через воду и экскременты зараженной рыбы. У

20 заболевших особей отмечают геморрагии различных тканей и органов, особенно около рта, в мускулатуре, жабрах, брюшной стенке, полостном жире, а также в переднем и заднем отделах кишечника. Наиболее остро болезнь проявляется у мальков, у более крупных рыб протекает хронически.

На территории Российской Федерации йерсиниоз выявлен в 2010 году, количество

25 случаев с каждым годом увеличивается, однако в список карантинных это заболевание не включено, что в виду массовой, но часто бесконтрольной перевозки рыбопосадочного материала способствует его распространению. Следовательно, с развитием контактов между странами, ростом и увеличением интенсивности аквакультуры внутри регионов данное заболевание имеет тенденцию повсеместного распространения в мире, поэтому

30 возникает необходимость своевременной диагностики, а также точной идентификации возбудителя.

Сейчас диагностика йерсиниоза в лаборатории основана на выявлении бактерий в посевах на питательных средах с последующим изучением их культурально-биохимических свойств. Этот метод долгий, а результат анализа часто зависит от таких

35 факторов, как опыт и компетенция специалиста, проводящего работу, качества используемой питательной среды и т.п., поэтому использование современных методов будет, несомненно, востребовано при диагностике [1].

В связи с вышеизложенным проблема диагностики и борьбы с йерсиниозом очень актуальна. Эффективно решить проблему своевременной и точной диагностики

40 заболевания позволит высокочувствительный и строгоспецифичный метод иммуноферментного анализа, широко распространенный для выявления болезней человека и животных, но недостаточно используемый в ихтиопатологии.

Единственным известным набором для проведения серологической диагностики болезней рыб является ТФ ИФА для выявления противогерпетических антител в сыворотке осетровых рыб, разработанный во ВНИИВВиМ в 2012 году, который

45 предлагается использовать в научно-исследовательских и ветеринарных лабораториях для ретроспективной диагностики герпесвирусной болезни сибирского осетра (SbSHV) у различных видов осетровых. Однако ретроспективная диагностика актуальна только

для вирусных болезней, т.к. позволяет проводить мониторинговые исследования при подозрении на герпесвирусную инфекцию осетровых рыб в межэпизоотический период, и не пригодна для диагностики бактериальных болезней за счет длительного времени образования антител в живом организме [2] (прототип).

5 При диагностике бактериальных инфекций важна оперативная информация, на ранних этапах развития заболевания и для быстрого подтверждения диагноза во время эпизоотии, поэтому необходимо анализировать наличие в организме рыб антигена.

Высокая контагиозность и смертность рыб при йерсиниозе обуславливают необходимость разработки экспресс-методов диагностики с целью быстрого и
10 своевременного принятия карантинных мер и профилактических мероприятий. Одним из таких методов является иммуноферментный анализ (ИФА), главными достоинствами которого являются высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при использовании других серологических методов, а также широкое распространение специального оборудования, позволяющего почти
15 полностью автоматизировать процесс выявления антигенов.

Задача настоящего изобретения - разработка чувствительного и эффективного способа серодиагностики йерсиниоза рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri*, на ранних этапах развития болезни и создание на его основе диагностического набора. Сведения по использованию ИФА-теста и существованию аналогичных диагностических наборов
20 для выявления йерсиниоза рыб в современной литературе отсутствуют.

Сущность изобретения состоит в использовании диагностического набора, включающего все необходимые компоненты для проведения иммуноферментного анализа, позволяющего выявлять антиген *Yersinia ruckeri* в образцах биологического материала от рыб на ранней стадии развития болезни с высокой специфичностью и
25 чувствительностью. Принцип способа заключается в следующем: специфические иммуноглобулины, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового микропланшета, связываются с гомологичными антигенами, присутствующими в исследуемом материале, образуя комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется путем взаимодействия с иммуноферментным конъюгатом, фермент
30 которого, после добавления субстрата, вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование окрашенного продукта. Интенсивность окраски в лунке микропланшета пропорциональна содержанию специфического антигена в испытуемом образце, результаты учитывают по общепринятой формуле.

Диагностический набор для выявления возбудителя йерсиниоза содержит: планшет
35 полистироловый 96-луночный, сенсibilизированный иммуноглобулинами к ERM; положительный контрольный образец, инактивированный (K^+); отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-); конъюгат, представляющий собой анти-ERM антитела, меченные пероксидазой хрена; раствор для разведения конъюгата (PK);
40 промыватель - концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином-80 (ФСБ-Т×25); субстрат - раствор тетраметилбензидина (ТМБ); стоп-реагент; ванночка для реагентов. Компоненты набора расфасованы в пластиковые флаконы разного объема с завинчивающимися крышками и упакованы в коробки.

ПРИМЕР 1

45 1. Подготовка исследуемого материала

Для обнаружения антигена *Yersinia ruckeri* в качестве испытуемого используют биопсийный материал внутренних органов (почка, печень, селезенка), экссудат и бактериальные культуры в концентрации не более $10^{5.0}$ - $10^{6.0}$ м.т. Для получения 10%-

ной суспензии биоматериал гомогенизируют до получения однородной массы на ФСБ (рН 7,2-7,4). Полученную суспензию сливают в стерильную посуду и используют для исследования.

2. Подготовка компонентов для постановки реакции

5 Для промывания планшетов, при постановке реакции, готовят содержащий твин-80 фосфатно-солевой буфер: размешивают содержимое флакона с ФСБ-Т*25, при выпадении в концентрате осадка прогревают его до полного растворения солей, и разводят дистиллированной водой до 700 мл. Хранят при 4°C до 5 суток.

10 Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят непосредственно перед использованием, к 0,05 мл концентрированного раствора добавляют 15 мл раствора для разведения конъюгата (РК), тщательно перемешивают.

15 Раствор ТМБ готов к применению, непосредственно перед использованием отбирают в пластиковую ванночку 12 мл. Остатки раствора ТМБ из ванночки нельзя сливать во флакон с исходным раствором ТМБ. Хранят при 4°C в течение всего срока годности набора.

3. Постановка реакции

Перед началом анализа лунки планшета промывают один раз промывочным раствором. В каждую лунку вносят по 300 мкл раствора, через пять минут после заполнения лунок раствор аккуратно удаляют. Остатки влаги из лунок тщательно 20 удаляют, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

25 В первую лунку первого ряда планшета вносят 100 мкл специфического положительного антигена (K⁺). Во вторую лунку первого ряда вносят 100 мкл отрицательного антигена. Во все остальные лунки по 100 мкл исследуемых образцов (желательно делать 2-3 повторности). Внесение материала в плашку сопровождают тщательным перемешиванием пипетированием в течение 5-7 секунд. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут.

Раствор конъюгата в рабочем разведении готовят за пять-десять минут до окончания инкубации.

30 По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т от несвязавшихся антигенов, после чего удаляют влагу, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

35 Во все лунки планшета вносят по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении. Планшет инкубируют при комнатной температуре (21-25°C) 60 минут. По окончании инкубации планшет отмывают четыре раза ФСБ-Т, после чего удаляют влагу постукиванием.

Во все лунки вносят по 100 мкл раствора ТМБ. Для внесения раствора ТМБ используют пластиковую ванночку, входящую в состав набора. Планшет инкубируют при комнатной температуре, в защищенном от света месте, 25-30 минут.

40 Реакцию заканчивают добавлением во все лунки 100 мкл стоп-реагента.

4. Учет результатов

45 Результаты реакции учитывают через 2-3 минуты после добавления стоп-реагента, проводя измерение оптической плотности (ОП) в каждой лунке на спектрофотометре с вертикальным лучом света при длине волны 450 нм или визуально. Результаты исследований учитывают только при соблюдении следующих условий:

- значение ОП в лунке с отрицательным контролем не более 0,30 о.е.
- значение ОП в лунке с положительным контролем не менее 0,62 о.е.

Реакцию оценивают по формуле и выражают в виде процента реактивности:

процент реактивности (%) = $(\text{ОП} - \text{ОПК}^-) / (\text{ОПК}^+ - \text{ОПК}^-) \times 100\%$,

где ОП - оптическая плотность образца, ОПК⁺ - оптическая плотность положительного контроля, ОПК⁻ - оптическая плотность отрицательного контроля.

Границы пороговых значений: при величине %>22% реакция считается положительной, значение %<10% - реакция отрицательная, а диапазон % от 10% до 22% - сомнительные результаты реакции.

ПРИМЕР 2

Подготовку исследуемого материала, подготовку компонентов для постановки реакции, постановку реакции осуществляют аналогично описанному в примере 1, но инкубацию планшета после внесения положительных, отрицательных и исследуемых образцов проводят в течение 4-6 часов при температуре 4°C (в холодильнике), после чего работу и учет результатов продолжают по стандартной схеме. Получают результаты, аналогичные таковым в примере 1.

Предложенный способ и набор не имеют отечественных и зарубежных аналогов. Позволяет в течение трех часов с достоверностью 98% определять в образцах биологического материала наличие *Y. ruckeri*, возбудителя йерсиниоза лососевых рыб. Использование «холодной инкубации» (в течение 4-6 часов при температуре 4°C, в холодильнике) позволяет получать достоверные, аналогичные результаты в течение одного дня, с перерывом для оператора в ходе работы, что по разным причинам также может быть удобно.

Диагностику разработан и апробирован с положительным результатом в лаборатории ихтиопатологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко в период октябрь 2013 - декабрь 2014 года.

Предложенный способ найдет применение в системе мониторинга, проводимого органами ветеринарной службы страны, что позволит контролировать заболеваемость йерсиниозом и сохранять здоровье культивируемых рыб, а также в научных исследованиях для получения информации о закономерностях циркуляции йерсиний вида *Yersinia ruckeri* в аквакультуре. Высокая чувствительность, специфичность, простота постановки реакции и возможность автоматизации процессов, за счет использования приборов, таких как промыватель, планшет и спектрофотометр с вертикальным лучом (ИФА-ридер), позволят в короткие сроки проводить массовые обследования в рыбоводческих хозяйствах с целью определения распространения заболевания. Оперативность анализа при данной инфекции имеет принципиальное значение, так как ускоренная диагностика позволяет максимально быстро приступить к лечению, тем самым оздоравливая и сохраняя поголовье.

Источники информации

1. Временные методические указания по диагностике йерсиниоза лососевых рыб // Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб (часть 2). Москва, отдел маркетинга АМБ-агро, 1999, с. 66-68.

2. Further virus characterization, diagnostics and prevention of Siberian sturgeon herpesvirus disease / Igor Shchelkunov, Andor Doszpoly, Tatiana Shchelkunova, Inna Prokaeva, Fatima Kalabekova, Ismail Kalabekov, Dmitry Kurenkov // USA-Russia Bilateral Workshop On Aquaculture and FishHealth USGS Western Fisheries Research Center, Seattle, WA, USA October, 2012, pp. 1-5 (прототип).

Формула изобретения

1. Способ серологической диагностики йерсиниоза лососевых рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri*, включающий взаимодействие специфических иммуноглобулинов с гомологичными антигенами и антителами, мечеными ферментом, добавление

субстратной смеси и учет результатов реакции по интенсивности окраски образовавшегося комплекса, отличающийся тем, что в реакции используют анти-ERM антитела, предварительно сорбированные на планшет, после внесения исследуемых проб по 0,10-0,11 мл инкубируют 60-65 минут при 21-25°C, отмывают, далее вносят конъюгат, состоящий из анти-ERM антител, меченых пероксидазой хрена, по 0,10-0,11 мл, инкубируют 60-65 минут при 21-25°C, отмывают, вносят 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, выдерживают 25-30 минут и проводят учет результатов реакции.

2. Диагностический набор для осуществления способа диагностики йерсиниоза лососевых рыб, вызываемого *Yersinia ruckeri*, отличающийся тем, что содержит все необходимые для анализа компоненты: планшет, сенсibilизированный иммуноглобулинами к ERM; положительный контрольный образец, инактивированный (K^+); отрицательный контрольный образец, инактивированный (K^-); конъюгат (анти-ERM антитела, меченные пероксидазой хрена); раствор для разведения конъюгата; концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином-80 (ФСБ-Тх25) для промывания планшета; субстрат - раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ); стоп-реагент; ванночку для реагентов.

20

25

30

35

40

45