



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **18446** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 39/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) ЕПІЗООТИЧНИЙ ШТАМ PASTEURELLA MULTOCIDA СЕРОВАРУ D**

1

2

(21) u200604400**(22)** 19.04.2006**(24)** 15.11.2006**(46)** 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.**(72)** Руденко Андрій Анатолійович**(73)** ЛУГАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**(57)** Епізоотичний штам № 99 *Pasteurella multocida* серовару D для виготовлення інактивованого бактерину проти респіраторно-кишкових захворювань кролів, що депонований у музеї мікроорганізмів лабораторії інактивованих вакцин кафедри якості та безпеки продукції АПК Луганського національного аграрного університету за № 99.

Корисна модель відноситься до області мікробіології та біотехнології, зокрема до технології виготовлення інактивованого бактерину проти респіраторно-шлункових захворювань кролів, одним з компонентів якого є епізоотичний штам №99 *P.multocida* серовару D.

Існує виробничий штам №9 *P.multocida* серовару D, який використовують для виготовлення емульсійної протипастерельозної вакцини [Патент на винахід РФ №2162339 від 17.04.2000, кл. А61К39/102] і має виражені протективні властивості у складі протипастерельозної вакцини на території РФ, однак у силу територіальної роз'єднаності України і РФ, у господарствах України циркулюють інші по соматичному антигену варіанти пастерел, що обумовлює більш низьку ефективність специфічної профілактики цього захворювання. До того ж, використання референтного штаму з колекції ВДНКІ РФ для виробництва біопрепарату неможливе через його відсутність в Україні.

Відомий епізоотичний штам №3 *P.multocida* серовару D українського походження, який використовують для виготовлення вакцини проти факторного (ендогенного) пастерельозу телят і поросят, емульсійної інактивованої [Патент на винахід UA №7437 від 15.06.2005, кл. А61К39/00, Бюл. №6, 2005р.] має низьку ступінь антигенної спорідненості з епізоотичними штамми, циркулюючими в кролівничих господарствах України.

Епізоотичний штам №99 *P.multocida* серовару D відноситься до роду *Pasteurella* сімейства *Pasteurellaceae* і був ізолюований в господарстві кролівника-аматора Воронова В.О. від хворого

пульмональним пастерельозом кроленяти в 2005р. При вивченні біологічних властивостей штам виявився патогенним для лабораторних тварин і імуногенним у складі інактивованого бактерину, захищаючи від захворювання не менш ніж 80% вакцинованих тварин.

В основу корисної моделі, поставлено задачу ізолювати від кролів, хворих на пневмоентерити, імуногенний штам *P.multocida* з високотехнологічними властивостями при виготовленні інактивованого бактерину і провести польові випробування цього виробничого штаму.

Епізоотичний штам №99 *P.multocida* серовару D зберігають в колекції живих культур лабораторії інактивованих вакцин кафедри якості та безпеки продукції АПК Луганського національного аграрного університету.

Епізоотичний штам №99 сімейства *Pasteurellaceae* роду *Pasteurella* виду *P.multocida* серовару D є збудником пастерельозу кролів і характеризується наступними властивостями.

Морфо-тинкторіальні властивості: у препаратах-мазках з добових культур, пофарбованих за Грамом, пастерели мають вигляд дрібних коккобактерій, розташованих поодинокі, попарно, короткими ланцюжками. При фарбуванні за Бурі-Гінсом виявляється капсула, що не профарбовується. У препаратах-відбитках із внутрішніх органів тварин (лабораторних і сільськогосподарських), які загинули від пастерельозу, при фарбуванні за Міхіним виявляються поліморфні біполярні мікробні клітини.

Культуральні властивості: епізоотичний штам №99 є швидкозростаючим факультативно-

(13) **U**(11) **18446**(19) **UA**

анаеробним мікроорганізмом. На м'ясопептоному бульйоні (МПБ) і агарі (МПА) він дає ріст, характерний для S-форм, на кров'яному МПА він росте у M-формі. На МПА в першу добу зазначений штам формує дрібні прозорі «росинчасті» колонії, що флуоресціюють при косому освітленні, в подальшому колонії збільшуються у розмірі і мутніють при старінні. У МПБ пастерели цього штаму в першу добу вирощування викликають незначне рівномірне помутніння, при струшуванні спостерігається феномен «муарові хвилі»; через 3-4 доби випадає слизуватий осад при струшуванні якого утворюється «кіска». На кров'яному агарі ця культура формує слизуваті непрозорі зеленувато-коричневі колонії, без зони гемолізу.

Біохімічні властивості: штам ферментує глюкозу, сахарозу, дульцит, манніт, слабко ферментує сорбіт; не ферментує лактозу, мальтозу; молоко не звертає, желатин не розплавляє; виділяє сірководень та індол; відновлює нітрати до нітритів; реакції з метиловим червоним і Фогеса-Проскауера були негативними.

Біологічні властивості: культура пастерел цього штаму є патогенною для лабораторних тварин. LD₅₀ для білих мишей складає $7 \cdot 10^5$ ЖМК із вірогідністю 95% ($P < 0,05$).

Стабільність основних властивостей штаму: штам зберігає свої властивості на м'ясопептоному напіврідкому агарі (МПНА) в умовах рефрижератора при +4-6°C протягом 6 місяців.

Патогенність штаму підтримують шляхом періодичного пасажування на білих мишах.

Стабільність генетичних властивостей: у штаму не спостерігається дисоціація протягом 6 місяців при періодичних пересівах в МПНА.

Штам вільний від іншої бактерійної мікрофлори та грибів.

Основні умови зберігання: пересіви через кожні 5-6 місяців на МПНА і збереження його в холодильнику при температурі +4-6°C.

Підтримання та оживлення штаму: пересіви на МПНА і недовготривале збереженням при +4-6°C та проведення через організм лабораторних тварин або кров'яний агар.

Приклад.

Запропонованим штамом №99 *P. multocida* сировар D користуються для виготовлення інактивованого бактерину для профілактики пневмоентеритів кроленят.

Для цього бактеріальну масу пастерел сироварів A, D, золотистого стафілококу, ешеріхій та бордетел ізольовано культивували на МПА 16-18 годин. Після чого в бактеріальну суспензію виробничих штамів вносили фосфатно-сечовинний буфер (рН 7,0-7,2), виходячи із з розрахунку 100мл буфера на 1л бактеріальної суспензії. Отриману суміш витримували 20 хвилин при 60°C, після чого вносили 0,5% формаліну і витримували при 38°C протягом 5 діб.

Отримані інактивовані антигени виробничих штамів об'єднували у рівних співвідношеннях (за оптичним стандартом мутності), доводили до 5млрд.мк.кл./см³ буферним розчином; в одержану суміш вносили 10% зависі аеросилу (6%) в розчині 0,9% натрію хлориду.

Виготовлений в такий спосіб інактивований бактерин є імуногенним, нешкідливим, слабкоректогенним і активним для профілактики інфекційних пневмоентеритів кролів.