



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 60761

(13) A

(51) 7 C 12 N 1 / 10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СЕРЕДОВИЩЕ ТОКСИНОНАКОПИЧЕННЯ ДЛЯ CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

1

2

(21) 2003021398

(22) 17 02 2003

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Бойко Петро Костянтинович

(73) ІНСТИТУТ ЕПІЗООТОЛОГІЇ УКРАЇНСЬКОЇ
АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Середовище токсинонакопичення для Clostridium Chauvoei, до складу якого входять пептон, глюкоза, натрію хлорид, цистеїну гідрохлорид, яке відрізняється тим, що додатково містить сіль бензилпеніциліну, натрію фосфат двозаміщений,

воду печінкову та м'ясну при наступному співвідношенні інгредієнтів, мас. %

пептон	1,0
глюкоза	1,0
натрію хлорид	0,5
натрію фосфат двозаміщений	0,2
цистеїну гідрохлорид	0,1
вода печінкова	30,0
вода м'ясна	30,0
сіль бензилпеніциліну	0,018
вода дистильована	решта

Винахід відноситься до ветеринарної мікробіології, імунології та епізотології і може бути використаним в процесі виготовлення вакцини проти емфізематозного карбункула.

Емфізематозний карбункул - дуже поширена в Україні ґрунтова інфекція. Найефективнішим заходом профілактики хвороби є активна імунізація сприйнятливої поголів'я тварин концентрованою гідроксид-алюмініевою формолвакциною (Біологіческие и химиотерапевтические ветеринарные препараты /Ф.И. Каган, А.И. Колесова - М. Сельхозгиз, 1963 - 516с.)

Недоліком цієї вакцини є те, що технологія її виготовлення є застарілою і матеріально затратною, а імуногенні властивості не відповідають сучасним вимогам до біологічних препаратів такого типу.

Зміна технології виробництва вакцини передбачає, в першу чергу, зміну живильного середовища, на якому культивують вакцинний штам.

Відомі результати досягнень по застосуванню середовищ для вирощування *Cl. chauvoei*, які складаються з пептону (4,0), глюкози (1,0), натрію хлориду (0,85), цистеїну гідрохлориду (0,05), дистильованої води до 100,0 (Gadala M S, Ikbai Farrag, Lotty O, Mahmoud M S, El-Danaf N, Doreya Scharaf, Mageda Hussain The immunogenicity of alum precipitated multicomponent clostridial vaccines // J Egypt Vet Med Ass - 1971 - Vol 31 - N 3-4 - P 135-152 і Jajaraman M S, Lal R, Dhanda M R

Toxin production by Clostridium chauvoei - // Indian vet J - 1962 - Vol 39 - N 9 - P 754-768)

Недоліком цих середовищ є те, що всі вони мають певну вузьку мету - збільшення виходу споривих форм, виявлення гемолізіну, тощо і не стосувалися зміни технології виробництва вакцини з метою підвищення її імуногенних властивостей.

В основу винаходу поставлено задачу розробити середовище, яке забезпечує контрольоване підвищення імуногенних властивостей вакцини шляхом збільшення кількості мікробних клітин та рівня екзотоксину в 1 см³, за одночасного зменшення затрат і прискорення виробництва.

Поставлена задача вирішується таким чином, що середовище, яке складається з пептону, глюкози, натрію хлориду, цистеїну гідрохлориду, додатково містить сіль бензилпеніциліну, натрію фосфат двозаміщений, воду печінкову та м'ясну при наступному співвідношенні інгредієнтів, в мас. %

Пептон	1,0
Глюкоза	1,0
Натрію хлорид	0,5
Натрію фосфат двозаміщений	0,2
Цистеїну гідрохлорид	0,1
Вода печінкова	30,0
Вода м'ясна	30,0
Сіль бензилпеніциліну	0,018
Вода дистильована	решта

(13) A

(11) 60761

(19) UA

Печінкова і м'ясна вода разом із пептоном, глюкозою, хлоридом і фосфатом натрію в повній мірі забезпечують ростові потреби *Cl chauvoei*.

Цистеїну гідрохлорид в розчинній фазі середовища відіграє роль окислювально-відновної системи, що забезпечує ріст в анаеробних умовах навіть такого вибагливого анаероба, яким є *Cl chauvoei*. Хімічно-активна і динамічна система, якою є окислювально-відновна система цистеїн-цистин, що утворюється у середовищі при додаванні цистеїну гідрохлориду, ефективно захищає вегетативні клітини анаеробів від впливу перекисів, що утворюються в процесі обміну речовин.

Бензилпеніцилін гальмує синтез клітинної стінки мікробів. Відомо, що молекулярний каркас клітинної стінки мікроорганізмів формується за рахунок пептидоглікану. Останній являє собою з'єднання за допомогою коротких пептидних ланцюжків гліканові полімери двох ацетильованих аміноцукрів - N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти. Солі пеніцилінової кислоти, що відносяться

до β -лактамів, блокують включення N-ацетилмурамової кислоти до складу гліканових полімерів. Це веде до припинення синтезу клітинної стінки. Остання, маючи високу ригідність, надає мікробній клітині тієї форми та розмірів, які генетично властиві даному виду мікроорганізмів. Відсутність клітинної стінки призводить до виникнення різноманітних форм, так званих L-форм або форм незбалансованого росту (ФНР). При цьому утворюються різної величини кулясті форми, як це ми спостерігаємо у збудника сибірки при постановці проби "перламутрового наміста", коли під впливом пеніциліну мікробні клітини, що розташовуються у виді ланцюжків, приймають однакову круглу форму, нагадуючи при цьому намісто.

Величина і розміри ФНР визначаються інтенсивністю обмінних процесів мікробної клітини, що є видовим показником.

Cl chauvoei під впливом бензилпеніциліну проявляє значний поліморфізм - кулясті форми

різної величини, від дуже великих (10 мкм і більше) до дрібних кокоподібних, розташування хаотичне - поодиночки, парами, короткими ланцюжками.

Крім цього культивування *Cl chauvoei* на середовищі токсинонакопичення пригнічує, а на 2-3-му пасажі зовсім гальмує спорогенез. Це в свою чергу веде до збільшення кількості вегетативних форм та виходу екзопродуктів, зокрема розчинного мікробного білка, який наділений токсичністю (летальною, гемолітичною та ін.) і якому відводиться найбільше значення у формуванні імунітету.

Поеднання цих трьох феноменів покладено в основу безперервної культури з метою максимального отримання екзотоксину *Cl chauvoei*.

Технологія отримання середовища наступна. В 30 см³ дистильованої води розчиняють 0,5 г натрію хлориду, 1,0 г глюкози, 0,2 г натрію фосфату двозаміщеного, 0,1 г цистеїну гідрохлориду та 1,0 г пептону. До цієї суміші додають по 30 см³ печінкової та м'ясної води. Після змішування інгредієнтів добавляють дистильовану воду, встановлюють рН 7,8 і фільтрують через фільтрувальний папір. Середовище фасують в скляний посуд (колби, пробірки). Обов'язково вказують об'єм середовища в посудині. Стерилізують при 0,5 атм протягом 30 хв.

Сіль бензилпеніциліну додають до середовища перед посівом досліджуваної культури з розрахунку 0,018 г (30 ОД) на 100 см³ середовища або 0,18 мг/см³ (0,3 ОД/см³). Розрахунок концентрації повинен бути точним, тому що границі росту є дуже вузькими і для *Cl chauvoei* лежать в межах 0,12-0,24 мг/см³ (0,2-0,4 ОД/см³).

Запропоноване нами середовище токсинонакопичення для *Cl chauvoei* збільшує вихід мікробного позаклітинного білка, що продукується клітинами *Cl chauvoei*, майже в 1,5 рази, дає можливість використання його в системі безперервного культивування.