



УКРАЇНА

(19) UA (11) 22917 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 1/20
A61K 39/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ LEPTOSPIRA INTERROGANS YEZ BRATISLAVA СЕРОГРУПА AUSTRALIS, СЕРОВАР BRATISLAVA ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЛЕПТОСПІРОЗУ ТВАРИН ТА ДІАГНОСТИКУМІВ

1

2

(21) u200700569

(22) 22.01.2007

(24) 25.04.2007

(46) 25.04.2007, Бюл. № 5, 2007 р.

(72) Кучерявенко Олексій Олександрович, Кучерявенко Олександр Олександрович, Піотрович Віталій Анатолійович, Волинець Вікторія Олександрівна, Уховський Віталій Вікторович, Дяченко Ганна Василівна, Дяченко Тетяна Олексіївна, Майорова Галина Костянтинівна, Піотрович Марія Михайлівна

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК

(57) Штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava, задепонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за номером 334 для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин та діагностикумів.

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології і може бути використана для виготовлення вакцин проти лептоспірозу тварин, який досить поширений на тваринницьких фермах і завдає значних економічних збитків.

Основним ефективним методом боротьби з лептоспірозом є вакцинація тварин. Штами збудника лептоспірозу, що пропонуються для виробництва вакцин повинні мати виражені антигенні та стабільні морфологічні, культурально-біохімічні властивості, бути високо імуногенними.

Аналогами корисної моделі є виробничі штами *Leptospira interrogans* ВГНКИ-1 серогрупа Grippotyphosa, *Leptospira interrogans* ВГНКИ-2 серогрупа Icterohaemorrhagiae, *Leptospira interrogans* ВГНКИ-3 серогрупа Canicola, *Leptospira interrogans* ВГНКИ-4 серогрупа Tarassovi, *Leptospira interrogans* ВГНКИ-5 серогрупа Hebdomadis, *Leptospira interrogans* ВГНКИ-6 серогрупа Pomona f Авторське свідоцтво №555664, 26.01.83; Авторське свідоцтво №828459, 30.01.83), *Leptospira interrogans* PSR-1 серогрупа Pomona, *Leptospira interrogans* серогрупа Sejroe сероеар hardjo (RU 2 030 915 C1, 20.03.1995), *Leptospira interrogans* "Рябужин" серогрупи Icterohaemorrhagiae сероеар copenhageni (RU 2 005 779 C1, 15.01.1994), *Leptospira interrogans* "Крыса-2" серогрупи Icterohaemorrhagiae сероеар copenhageni (RU 2 049815 C1, 10.12.95) на

основі яких виготовляють інактивовану полівалентну вакцину проти лептоспірозу.

Найближчим аналогом корисної моделі є виробничий штам *Leptospira Icterohaemorrhagiae* ВГНКИ-2, який використовується для виробництва інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин (Авторське свідоцтво №555807, 30.01.83). Використання штаму бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava в біологічній промисловості України неможливе за його відсутністю. Для розробки засобів профілактики та діагностики лептоспірозу необхідно мати вітчизняні високо імуногенні штами.

В основу корисної моделі, що представлена, поставлено задачу отримати штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava, що має підвищену імуногенну активність, володіє стабільними морфологічними та культурально-біохімічними властивостями, високою потенцією росту, яка сприяє отриманню великої кількості біомаси для виготовлення вакцин та діагностикумів проти лептоспірозу.

Штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava отриманий з Берлінського інституту захисту прав споживачів і ветеринарної медицини (м. Берлін) в 1997 році, який клоновано та селекціоновано в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських

(13) U

(11) 22917

(19) UA

тварин з музеєм штамів мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини УААН.

Штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava задепонований в колекції мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів 28.11.2005 року і має реєстраційний номер 334.

Морфологічні властивості. Суворий аероб. Оптимальна температура для культивування 28-30°C. Грам негативні спірохети. У темному полі мікроскопа мають вигляд матових тонких рухомих ниточок. Погано фарбуються аніліновими барвниками. Концентрація водневих іонів середовищ для культивування 7,2-7,4.

Патогенні властивості. Патогенний для людини та тварин.

Антигенні властивості вивчали в досліді на кроликах. Для цього прямій імунізації антигеном, з накопиченням 80-100 лептоспір у полі зору мікроскопа, одноразово піддали дорослих кролів вагою 3-3,5кг внутрішньо по 0,75см³. Для проведення роботи був використаний вакцинний штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava відповідно 7-10 добового віку. На 7, 14, 25 добу після введення у кролів відбирали кров з метою дослідження сироваток в РМА та наростання титрів антитіл. При цьому порівнювали титр антитіл кролів, яким вводили культуру штаму. Результати досліді приведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Титри антитіл в сироватках крові кролів імунізованих дослідними антигенами, М±m, n=5

Найменування штамів	Титри антитіл в сироватках крові кролів на день після вакцинації:		
	7	14	25
<i>Leptospira interrogans</i> Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava	1:86,9±8,3	1:392,1±19,7	1:670±23

Різниця між титрами досліджуваних сероваріантів на початку та наприкінці досліді була значною з високим ступенем достовірності (P<0,005).

Генетичні особливості штаму. Стійкий до дії фурагіліну, фурагіну, 5-фторурацилу.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму. Для культивування використовуються живильні середовища Терських, Кортгофа та дві його модифікації (рН живильних середовищ 7,2-7,4) з вмістом 10% сироватки крові овець або 7-10% сироватки крові кролів. Середовище Терських та Кортгофа готуються в лабораторних умовах за загальноприйнятою методикою, а модифіковані середовища Кортгофа згідно розроблених та затверджених нормативних документів. Сироватка крові овець попередньо інактивується 2 години при температурі 56°C, а сироватка крові кролів - 30 хв. при температурі 56°C. Адаптація штаму до середовищ з вмістом сироватки крові овець взамін середовища з вмістом сироватки крові кролів проводиться згідно розроблених способів адаптації. Також використовується середовище ЕМЖН (рН - 7,6-7,8).

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Зберігається в умовах культивування шляхом періодичних пересівів на живильні середовища з вмістом сироватки крові овець чи кролів. Періодичність пересівів 10-14 днів.

Вірулентність. Вивчення вірулентності штаму проводили по загальноприйнятій методиці на морських свинках, кроленятах-сисунах і золотистих ховрашках. Визначена LD₅₀ для золотистих ховрашків складає 2·10⁴ мікробних тіл. Клінічне виявлення інфекції у експериментальних тварин характеризується жовтяницею видимих слизових

оболонь, тремтінням скелетних м'язів, пригніченим станом, відмовою від поїдання корму, гемоглобінурією.

Імуногенність. Штаму властива виражена імуногенна активність. Інактивованій 0,25% водним фенолом або 0,25% водним розчином формальдегіду, він захищає від загибелі і розвитку інфекції 100% ховрашків заражених *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava в дозі, в декілька раз перевищуючи летальну, при 100% загибелі не вакцинованих контрольних тварин.

Зі штаму *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava отримана вакцина, яка була випробувана в експерименті на тваринах.

Приклад 1.

У 7-10 денну лептоспірозну культуру (не менше 70-90 лептоспір в полі зору мікроскопа), інактивовану 0,25% водним розчином фенолу в кінцевій концентрації, додавали 65% водний розчин ПЕГ до кінцевої концентрації його 7%. Через 3 доби надосадову рідину зливали, концентруючи антиген в два рази.

Готові зразки дослідних вакцин підлягали перевірки на нешкідливість, токсичність, стерильність, імуногенність.

Готовий вакцинний препарат вводили кролям (3-3,5кг) в латеральну вену вуха в дозі 0,75см³.

В нижченаведених таблицях наведена міра імунологічної відповіді піддослідних тварин на 25 добу після застосування вакцини, що виражена в титрах антитіл.

Таблиця 2

Титри антитіл кролів у відповідь на застосування вакцини зі штаму бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava на 25 добу після застосування, $M \pm m$, $n=9$.

Назва штаму	Титри антитіл кролів
<i>Leptospira interrogans</i> Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava (штам з яким не проводились роботи по підвищенню імуногенної активності)	1:125 \pm 19
<i>Leptospira interrogans</i> Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava (клонований та селекціонований в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів IBM УААН)	1:370 \pm 67

Якщо проаналізувати дані таблиці, то можна зробити висновок, що вакцина, до складу якої входить антиген штаму *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava (клонований та селекціонований в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів IBM УААН), що пройшов цикл підвищення антигенної та імуногенної активності, виявився у 2,94 рази більш імуногенним з високим ступенем достовірності ($P < 0,005$), ніж *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava (штам з яким не проводились роботи по підвищенню імуногенної активності (вихідний штам)).

Приклад 2.

Золотистих ховрашків вагою - 40-50г імунізували інактивованою вакциною, виготовленою зі штаму *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava (клонований та селекціонований в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів IBM УААН) в кількості 10 голів в дозі 1 см³ внутріочередово. На 25 добу проводили зараження імунізованих і контрольних ховрашків летальною дозою. Всі імунізовані тварини залишилися живими, симптоми захворювання були відсутні, з органів забитих тварин при висівах на поживне середовище лептоспіри виділенні не були. Всі неімунізовані тварини загинули з ознаками характерними для лептоспірозу.