



УКРАЇНА

(19) UA (11) 51379 (13) A

(51) 6 A61K39/10

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ШТАМ BRUCELLA OVIS 67/Б ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ЕМУЛЬСИН-ВАКЦИНИ ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОГО ЕПІДИДИМИТУ БАРАНІВ

1

2

(21) 2002031887

(22) 07 03 2002

(24) 15 11 2002

(46) 15 11 2002, Бюл. №11, 2002 р

(72) Бабкін Анатолій Федорович, Орпов Сергій Миколайович, Галіщев Микола Гнатович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Штам Brucella ovis 67/Б для виготовлення інактивованої емульсин-вакцини проти інфекційного епідидиміту баранів, який депонований та зберігається за номером 219 у колекції мікроорганізмів лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків, Україна

Винахід відноситься до ветеринарної мікробіології та біотехнології, зокрема до виготовлення імуногенних штамів Brucella ovis, які використовують для виробництва вакцин проти інфекційного епідидиміту (ІЕ) баранів.

Відомо про штам B. ovis 64 (колекція BIEB, Росія), який використовують для виготовлення інактивованої емульсин-вакцини проти ІЕ баранів (Ветеринарія — 1998 — №3, С 15 - 20). Використання цього штаму в біологічній промисловості України неможливе за його відсутності.

Для розробки засобів специфічної профілактики інфекційного епідидиміту баранів необхідно мати вітчизняні високоімуногенні штами.

В основу винаходу, що передбачається, поставлено завдання знайти імуногенний штам Brucella ovis для виготовлення інактивованої емульсин-вакцини проти інфекційного епідидиміту баранів, шляхом дослідження музейних і польових штамів B. ovis 67 Б для виготовлення інактивованої емульсин-вакцини проти інфекційного епідидиміту баранів, який депонований та зберігається за номером 219 у колекції мікроорганізмів лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби Інституту експериментальної та клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків, Україна.

Вакцинний штам B. ovis 67/Б має стабільну R-форму й вирощується на м'ясо-печінковому пептонно-глюкозо-гліцериновому агарі (МППГГА) з 10% сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) рН 7,0 - 7,2 в умовах збільшеної кількості CO<sub>2</sub> в атмосфері при 137 - 38°C.

Штам має такі культурально-морфологічні та антигенні властивості:

- у посівах на МППГГА з сироваткою через 72 години виростають дрібні, круглі, випуклі, напів-

прозорі колонії з сіро-блакитним відтінком в прохідному світлі. Після фарбування 0,05% розчином кристал-фіолету за Уайт-Вілсоном 4 - 5 добової культури у чашках Петрі колонії мають синьо-фіолетове забарвлення,

- на м'ясо-печінковому пептонно-глюкозо-гліцериновому бульйоні (МППГБ) - слабе помутніння з осадом у вигляді аглютинату,

- штам не продукує сірководень,

- росте у напіврідкому агарі з тїонином у концентрації 1:50000 і не росте з основним фуксином у такій же концентрації,

- в мазках, пофарбованих за Козловським, Штампом або Грамом (Настанова по діагностиці бруцельозу тварин — Київ — 1998, С 6) мають форму дрібних коків та поліморфних паличок червоного кольору (0,5 - 0,7 × 0,7 - 1,2 мкм),

- бактерії аглютинуються в триафлавіновій пробі і реакції термоаглютинації,

- культура аглютинується R-родо- і видоспецифічними бруцелозними сироватками і не аглютинується S-бруцельозною сироваткою.

Штам вільний від контамінації іншої бактеріальної мікрофлори та грибами.

Підтримання штаму проводять шляхом пересіву з інтервалом 1,5 - 2 місяці на середовищі МППГГА з 10% сироватки ВРХ в умовах збільшеної кількості CO<sub>2</sub> в атмосфері вирощування.

Основні умови зберігання - штам зберігають в пробірках на МППГГА з 10% сироватки ВРХ під гумовими пробками або у ліофілізованому стані в ампулах при 14 - 10°C.

Імуногенні властивості штаму B. ovis 67/Б пояснюються наступними прикладами.

Приклад 1. В досліді на 48 морських свинках вивчали імуногенність двох музейних (65939 і

(13) A  
(11) 51379  
(19) UA

"Болград") і двох польових (7807 і 8206) штамів *B. ovis* з колекції культур бруцел лабораторії вивчення хвороб рогатої худоби. Культури штамів вирощували на МППГГА з 10% сироватки ВРХ в умовах збільшеної кількості  $\text{CO}_2$  в атмосфері вирощування впродовж 3-х діб. Культуру бактерій змивали фізіологічним 0,85% розчином натрію хлориду. Суспензію бруцела овис інактивували формаліном в концентрації 0,4% при  $t$  37°C одну добу, досліджували на стерильність і повноту інактивації у спосіб висівів на МППГГБ і МППГГА з сироваткою в умовах збільшеної кількості  $\text{CO}_2$  при  $t$  37°C. Інактивовану суспензію бруцела овис змшували на гомогенізаторі з масляним ад'ювантом, контролювали вакцину на стерильність у спосіб висівів на МППГГБ, МППГГА з сироваткою, середовище Кпт-Тароцці при  $t$  37°C, а також висівів на середовище Сабуро при  $t$  22 - 24°C впродовж 10 діб. Інактивовану емульсин-вакцину вводили під шкіру в об'ємі 1,0 см<sup>3</sup>. Вакциною з кожного штаму провели щеплення по 2 групи морських свинок в дозах 200 тис і 200 млн м.к., контрольним групам вводили підшкірно масляний ад'ювант з фізрозчином.

Контроль імунітету провели через 34 добу після щеплення шляхом зараження окремо кожної щепленої групи тварин суспензією штаму бактерій бруцела овис, гомологічного вакцині, в дозі 2 млрд м.к./см<sup>3</sup> підшкірно в об'ємі 1,0 см<sup>3</sup>. Діагностичний забій, серологічні (РА, РТЗК) і бактеріологічні дослідження провели через місяць після контрольного зараження.

Одержанні результати дослідження свідчать, що всі три штами в дозі 2 млрд м.к. заразили всіх морських свинок в контрольних групах з високим індексом інфікованості (ІІ) - 50,0 - 70,0%. Серологічні зрушення в крові виявили в РА і РТЗК та були приблизно однакові в усіх групах щеплених морських свинок.

Протективні властивості були більшими у штаму "Болград" - 100,0% імунітет в обох групах, щеплених відповідно 200 тис і 200 млн м.к.

В групах морських свинок, щеплених другими штамами, напруження імунітету змінювалось в залежності від концентрації бактерій в вакцині. Імунітет виявили при концентрації 200 тис і 200 млн м.к. відповідно у 50 і 100% - для штаму 7807, у 25 і 75% - для штаму 8206. Штам 65939 в дозі 200 тис м.к. виявився не імуногенним, а в дозі 200 млн м.к. - імунітет був у 75% тварин.

Таким чином, штам *B. ovis* 67/Б ("Болград") використовували як перспективний для виготовлення мікросерій інактивованої емульсин-вакцини.

Приклад 2. По технології, що наведена в прикладі 1, виготовили дві мікросерії інактивованої емульсин-вакцини з штаму *B. ovis* 67/Б. Двом дослідним групам морських свинок по 12 голів вводили під шкіру вакцину в дозі 20 і 200 млн м.к. в об'ємі 0,5 см<sup>3</sup>, контрольній групі (11 голів) - ад'ювант з фізрозчином. Серологічні дослідження, проведені до зараження, виявили в сироватці всіх щеплених морських свинок антитіла в РТЗК в титрі 1:5 - 1:10 (0,93  $\pm$  0,041g) і в РІД - позитивна реакція з бруцелаовісним антигеном. Через 2 місяці після вакцинації тварин щеплених і контрольної груп заразили вірулентним штамом *B. ovis* 8406 підшкі-

рне в дозі 2 млрд м.к. Діагностичний забій, серологічні та бактеріологічні дослідження провели через 45 діб після зараження. У щеплених тварин бруцелаовісна серопозитивність становила в РТЗК - 1:5 - 1:10 (0,98  $\pm$  0,021g) та РІД. В контрольній групі інфікованих морських свинок виявили 81,8% реагуючих в РТЗК в титрі не більше 1:5 і 36,4% тварин - в РІД. Бактеріологічними дослідженнями імунітет в 1-й групі виявлено у 11 з 12 морських свинок (91,6%) і в 2-й групі у всіх 12 морських свинок (100%). В контролі культуру *B. ovis* виділили у 10 (90,9%) морських свинок з ІІ - 36,8%. Встановлено також, що щеплення емульсин-вакциною не викликала бруцельозної серопозитивності з S-антигеном в РБП, РА і РЗК.

Приклад 3. По технології, що наведена в прикладі 1, виготовили експериментальну серію № 1 інактивованої емульсин-вакцини з штаму *B. ovis* 67/Б. Концентрація бруцел в серії вакцини складала 2,5 млрд м.к./см<sup>3</sup>. Випробування вакцини на антигенність та імуногенність провели в двох дослідках на 10 вакцинованих і 8 контрольних баранах в віці 9 місяців. Вакцину інюкулювали підшкірно в області паху в дозі 5 млрд м.к. в об'ємі 2,0 см<sup>3</sup>. Контрольним 4-м баранам вводили ад'ювант на фізрозчині, а другим чотирьом баранам препарат не застосовували. Через 6 (дослід 1) і 12 (дослід 2) місяців після вакцинації щеплених та контрольних баранів заразили суспензією 3-х добової культури бруцела овис в концентрації 5 млрд м.к. штаму *B. ovis* 8406 і штаму *B. ovis* 08337 шляхом аплікації по 0,1 см<sup>3</sup> на кон'юнктиву обох очей та по 0,8 см<sup>3</sup> на слизову препуцції. Діагностичний забій і бактеріологічне дослідження провели через 30 - 58 діб після зараження.

При дослідженні в РА, РТЗК, РІД з бруцелаовісним антигеном у вакцинованих баранів в двох дослідках виявили серопозитивність до зараження. Бруцелаовісна серопозитивність зберігається до кінця дослідження в першому досліді титри в РА були - 1:25 - 1:100 (1,76  $\pm$  0,131g), РТЗК - 1:10 - 1:80 (1,36  $\pm$  0,161g), РІД - 1:4 - 1:16 (2,2  $\pm$  0,72log<sub>2</sub>), в другому досліді титри в РА - 1:25 - 1:100 (1,7  $\pm$  0,141g), РТЗК - 1:5 - 1:80 (1,3  $\pm$  0,281g), РІД - 1:32 - 1:64 (5,3  $\pm$  0,55log<sub>2</sub>). Бактеріологічне дослідження після контрольного зараження через 6 і 12 місяців були від'ємні, що показує повний захист щеплених тварин.

В контрольних інфікованих групах після зараження барани позитивно реагували в серологічних реакціях з бруцелаовісним антигеном в першому досліді титри в РА - 1:25 (1,4  $\pm$  0,1g), РТЗК - 1:5 (0,35  $\pm$  0,231g) і в РІД - позитивно, в другому досліді титри в РА - 1:25 - 1:50 (1,2  $\pm$  0,461g), РТЗК - 1:10 (1,0  $\pm$  0,1g), РІД - 1:8 - 1:16 (3,8  $\pm$  0,28log<sub>2</sub>). В контрольних групах виділили культуру заражаючого штаму *B. ovis* в першому досліді у 3-х з 4-х баранів з ІІ - 31,2% та у 2-х з 4-х в другому досліді з ІІ - 23,1%.

Встановлено також, що щеплення інактивованою емульсин-вакциною проти ІЕ баранів не викликає бруцельозної серопозитивності з S-антигеном в РБП, РА та РТЗК, що забезпечує можливість серологічне контролювати на бруцельоз щеплених тварин.

---

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)  
вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна  
(044) 456 – 20 – 90

---

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»  
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна  
(044) 216 – 32 – 71