



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **60866** (13) **A**
(51) **7 A61K39/102, C12N1/20**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ**(54) ШТАМ PASTEURELLA MULTOCIDA СЕРОТИПУ D**

1

2

(21) 2003032464

(22) 21 03 2003

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Мазур Тетяна Василівна, Волинець Леонід
Кузьмич(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УК-
РАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК(57) Штам *Pasteurella multocida* №3 серотипу D, що
застосовується в ветеринарній біотехнології, за-
депонований в колекції мікроорганізмів Державно-
го науково-контрольного інституту біотехнології та
штамів під реєстраційним номером 271

Галузь техніки, до якої відноситься винахід, ветеринарна, мікробіологічна, біотехнологічна промисловість

Винахід застосовується в технології виготовлення "Вакцини проти пастерельозу, сальмонельозу та колибактеріозу свиней "Пасако" та "Набору типових сироваток для індикації та ідентифікації штамів *Pasteurella multocida*"

Аналогом технічного рішення є штами роду *Pasteurella multocida*, що входять до серологічного типу "B". У свиней збудники цього типу викликають септичну форму хвороби. На даний момент при виготовленні протипастерельозних профілактичних препаратів застосовуються штами серологічного типу "B" [1,2]. За цих умов тяжко здійснювати діагностику та профілактику хвороб, що викликаються *Pasteurella multocida* серотипу "D" (інфекційні пастерельозні пневмонії, атрофічний риніт). Адже антигенна спорідненість штамів серотипу "B" та "D" *Pasteurella multocida* складає 20%.

Суть винаходу і його ознаки. В основу винаходу покладена мета виділити штам *Pasteurella multocida* серотипу "D", антигенне відмінний від штамів серотипу "B", має високу вірулентність та імуногенність, який можна застосовувати в технології виготовлення діагностичних та профілактичних біопрепаратів. Для досягнення цієї мети дослідження властивості ряду штамів, типових для *Pasteurella multocida* серотипу "D".

Технічний результат. Штам *Pasteurella multocida* серотипу "D" №3 виділений з трупів свиней в Кіровоградській області в 1999 році, яка хворіла на пастерельоз. Ретельно вивчені його біохімічні,

морфологічні, вірулентні, антигенні та імуногенні властивості.

Штам задепонований в колекції мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів має реєстраційний номер 270.

Штам *Pasteurella multocida* серотипу "D" №3 досить стабільний, характеризується наступними властивостями.

Морфологічні властивості. Штам має характерні для мікроорганізмів даного виду короткі, овоїдні грамнегативні нерухомі палички, спор не утворює. Має ліпополіцукрову капсулу, біохімічний склад якого притаманний мікроорганізмам сероваріанту "D" *Pasteurella multocida*.

Культуральні властивості. Штам добре росте на звичайних поживних середовищах з pH=7,2-7,4.

На м'ясопептонному бульйоні утворює рівномірне помутніння через 10-12 годин, на м'ясопептонному агарі через 24 години культивування утворює дрібні прозорі округлі блискучі колонії блакитного відтінку (S-форма).

Ферментативні властивості. Штам ферментує до кислоти без утворення газу глюкозу, цукрозу, галактозу, маніт, сорбіт, не ферментує лактозу, дульцит, ксилізу, рамнозу, арабінозу, мальтозу. Редує нітрати в нітрити. Утворює індол. Не утворює сірководень. Не гемолізує еритроцити.

Вірулентні властивості. Штам вірулентний для білих мишей (ЛД₅₀ -10⁶-10⁷ мікробних тіл при підшкірному введенні), кролів, великої рогатої худоби, свиней, дрібної рогатої худоби. У свиней викликає пастерельозну пневмонію та атро-

(13) **A**
(11) **60866**
(19) **UA**

фічний ринг

Диференціація виділеного штаму *Pasteurella multocida* №3 здійснюється за антигенними та імуногенними особливостями

Для диференціації штаму за антигенними властивостями готують капсульний антиген. Добову агарову культуру штаму змивають фізіологічним розчином, доводять до концентрації 20×10^8 мікр. тіл/см³, поміщають в водяну баню на 45 хвилин при 56°C.

Потім культуру центрифугують при 4,5-5,0 тис об/хв, протягом 30 хвилин. Надосадову рідину збирають окремо, що являє собою капсульну субстанцію.

Типування штаму за капсульним антигеном здійснюють в реакції дифузійної преципітації. Для цього в плексиглазових чашках Петрі з 1%-м агаром діркою проробляють спеціальним стандартним штампом лунки. В центральну лунку вносять капсульну речовину (антиген) *Pasteurella multocida* №3 серотипу "Д", а в периферійні - окремо типоспецифічні сироватки, отримані на штам серотипу "Д" та штам серотипу "В".

Чіткий результат реакції буде спостерігатись тільки у випадку взаємодії капсульного антигену штаму *Pasteurella multocida* №3 серотипу "Д" з гомологічною сироваткою. Це свідчить про антигенну своєрідність пропонованого штаму.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Антигенну особливість штаму *Pasteurella multocida* №3 серотипу "Д" чітко ілюструє дослід по зараженню ним та штамом гетерогенного серотипу "В" чутливих тварин (свиней). Результати випробувань демонструють розвиток за цих умов різних форм захворювання (табл. 1).

Після внутрішньо-м'язового зараження тварин штамом №9 серотипу В протягом перших 2-х діб захворіли й загинули всі поросята з ознаками сепсису. При інтраназальному введенні цього ж штаму тваринам іншої групи захворіло 1 порося з підвищенням температури тіла. При патологоанатомічному дослідженні цієї тварини змін, притаманних пастерельозній інфекції виявлено не було.

На відміну від другої групи в першій групі тварин на п'яту добу після інтраназального зараження спостерігалось погіршення клінічного стану з ознаками пневмонії. При внутрішньо-м'язовому зараженні тварини залишалась клінічне здоров'ям. При патологоанатомічному дослідженні тварин, що хворіли, були виявлені типові ознаки катарально-геморагічної пневмонії. Крім того, у всіх хворих тварин помічені зміни носового кістково-хрящового комплексу.

Контрольна група тварин змін не мала.

Таким чином, штам серотипу "Д" викликає відмінний від штаму серотипу "В" перебіг хвороби й має свій характерний шлях проникнення до організму.

Таблиця 1

Схема дослідів та результати експериментального зараження поросят різними збудниками пастерельозу

№	Тип збудника та шлях зараження	Кількість дослідних тварин	Кількість голів, що			
			Захворіли		Мали патологоанатомічні зміни	
			п	Р	п	Р
1	Група 1 Серовар Д <i>Pasteurella multocida</i> №3					
	Інтраназально	3	2	0,05	2	0,01
	Внутрішньо-м'язово	2	0	0,05	-	0,001
2	Група 2 Серовар В <i>Pasteurella multocida</i> №9					
	Інтраназально	2	2	0,01	-	0,01
	Внутрішньо-м'язово	2	2	0,01	2	0,01
3	Група 3 Контроль без зараження	2	0	-	0	-

Приклад 2. Імуногенні особливості штаму *Pasteurella multocida* №3 визначали в досліді з перехресним зараженням білих мишей.

Для цього 12 груп білих мишей щепили моновакциною, виготовленою на основі антигенно-відмінного штаму *Pasteurella multocida* №9 серовару

В, в різних імунізуючих дозах. Ще дві групи мишей залишались не щепленими - контроль. Через 2 тижні шість груп мишей, щеплених різними дозами моновакцини та одну контрольну групу заразили 5ЛД₅₀ штаму №3 *Pasteurella multocida* серовару Д. Результати дослідів подані в таблиці 2.

Таблиця 2

Імуногенність штамів пастерел різних серогруп

Доза щеплення моновакциною	Об'єм дози щеплення, см ³	Заражаюча доза культур, ЛД ₅₀	Pasteurella multocida			
			Штам №3		Штам №9	
			а\в	КІЕ, %	а\в	КІЕ, %
Нативна	0,5	5	9/10	10	0/10	100
0,5	-	-	10/10	0	0\10	100
0,25	-	-	10/10	0	0\10	100
0,125	-	-	10/10	0	0\10	100
0,0625	-	-	10/10	0	0\10	100
0,03125	-	-	10/10	0	1\10	90
0,0156	-	-	10/10	0	3\10	70
Контроль	-	-	10/10	-	1\10	-

Примітка а\в - відношення загиблих мишей до залучених в дослід

При повній загибелі обох контрольних груп мишей превентивна активність моновакцини зі штаму *Pasteurella multocida* №9 серовару В була 100%-ю в переважній кількості випадків. Порівняно з іншими групами білих мишей, які були заражені антигенно відмінним штамом серотипу Д, цей показник не перевищував 10%.

Таким чином, відмінність імуногенних властивостей штамів різних серологічних типів №3 та №9 очевидна.

Задепонований в ДНКІБШМ штам *Pasteurella multocida* №3 серовару "Д" морфологічно, антигенно й імуногенно особливий та стабільний по

відношенню до відомих виробничих штамів серологічного типу "В" *Pasteurella multocida*. Це дає підстави рекомендувати його для виготовлення протипастерельозних біопрепаратів профілактичного та діагностичного призначення.

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ

1 Інструкція по виготовленню та контролю "Вакцина проти пастерельозу, паратифу та диплококової інфекції поросят" від 21 09 1995р

2 Інструкція по виготовленню та контролю "Формолвакцини проти пастерельозу овець та свиней прециптованої" від 01 03 1995р