



УКРАЇНА

(19) UA (11) 14759 (13) A

(51) C 12 N 1/20; A 61 K 39/12

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДБез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23.XII. 1993 р.Публікується
в редакції заявника(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS ALVEI*-413 – ПРОДУЦЕНТ АНТИГЕНА ГЕРПЕСВІРУСА-І
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

1

(21) 93007515
(22) 02.11.93
(24) 18.02.97
(46) 30.06.97. Бюл. № 3
(47) 18.02.97
(72) Фукс Поліна Павлівна, Голуб Юрій Степанович, Гончарова Лариса Васильовна, Волосянко Олена Вікторівна

2

(73) Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини (UA)
(57) Штамм бактерій *Bacillus alvei* – продуцент антигена герпесвірусу-І крупного рогатого скоту ІЗКВМ УААН № 413.

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии и вирусологии и может быть использовано в биотехнологии, в практике работы ветбаклабораторий и научно-исследовательских институтов.

Известен штамм *Bacillus alvei* (Смирнов А.М. Диагностика бактериальных болезней расплода. – Журнал, "Пчеловодство", М., "Колос", 1984, № 2, с. 20) – грубая, спорообразующая палочка, длиной 3,0 – 4,5, шириной 0,7–1,0 мкм, по Граму красится положительно, подвижная, перетрих. Споры располагаются центрально, крупные – 2,5–4,0 мкм в длину и 0,8–1,5 мкм в ширину, иногда образует ряды в виде частокола. Факультативный аэроб, растет при 37°C на МПА и МПБ, кровяном агаре Цейслера, через сутки образуя на агаре крупные колонии неправильной формы в виде "оленьих рогов", грязно-желтого цвета, на агаре Цейслера образует гемолиз типа β , иногда α , бульон мутит равномерно. На 3–5 день на поверхности бульона образуется бесцветная или сероватая, гладкая, нежная, нестабильная

пленка со слабым пристеночным кольцом, при встряхивании опадающая на дно пробирки. Желатину медленно разжижает, молоко свертывает и пептонизирует, индола не образует, обнаруживаются следы аммиака и сероводорода, крахмал не гидролизует нитраты не восстанавливает. Расщепляет глюкозу, мальтозу, глицерин, лактозу, сахарозу с образованием кислоты, но без газа. Биохимические свойства непостоянны, старые культуры имеют неприятный запах, особенно сильный при культивировании микроба на кровяном агаре.

Известен также штамм бактерий *Bacillus alvei* – продуцент рестриктазы BAVI (авт.св. СССР № 1678833, кл. C 12 N 9/14 от 12.07.90), который характеризуется следующими свойствами: Морфологические и культурально-биохимические свойства. Палочки размером 0,5–0,8 x 2–3 мкм расположены поодиночке и парами, споры. Грам-положительны (признак непостоянный, варьирует). Клетки подвижны (признак варьирует). Культура хорошо растет на твердых и жидких

(19) UA (11) 14759 (13) A

питательных средах: мясо-пептонном агаре, бульоне Хоттингера, среде LB. На скошенном агаре дает слабый нежный налет, на МПА растет в виде мелких, блестящих, выпуклых колоний с ровными краями. На мясо-пептонном бульоне и бульоне Хоттингера – равномерное помутнение, сероватая нежная пленка. Отношение к кислороду – аэроб. Утилизация углеводов – на глюкозе, лактозе, сахарозе образует кислоту. Лакмусовое молоко свертывает, пептонизирует. Индол не образует. Желатину разжижает. Штамм вырабатывает на питательной среде, содержащей бульон Хоттингера в условиях аэрации и из полученной биомассы выделяют известными способами рестриктазу.

Известен также штамм *Bacillus alvei* ВГНКИ № 94/84, используемый для изготовления биопрепаратов против европейского гнильца пчел (авт. св. СССР № 1338388, кл. С 12 N 1/20, А 61 К 39/00 от 27.03.85), который характеризуется следующими культурально-морфологическими и биохимическими свойствами: грамположительные палочки, расположенные одиночно или короткими цепочками. Образуют овальные споры, расположенные на конце клетки. Факультативный аэроб, растет при 37°C, способен культивироваться в температурных интервалах 15–47°C, устойчив при воздействии температуры 80°C в течение 2 ч. В МПБ культура вызывает слабое помутнение среды, на поверхности иногда образует пленку, на дне пробирки – осадок, при встряхивании поднимающийся в виде косы. Культура растет в среде с 6,5% хлористого натрия, 10 и 40% бычьей желчи.

На мясо-пептонном, рыбном и кровяном агарах образует плоские или слегка выпуклые колонии с неровными краями, сливающиеся в сплошной рост. Колонии серо-белого цвета, имеют радиальную исчерченность. Ферментативные свойства. Сбраживает глюкозу, мальтозу, лактозу, маннит, сорбит с образованием кислоты. Арабинозу, ксилозу, сахарозу, рамнозу, дульцит, инозит, рафинозу, галактозу не ферментирует. Желатину разжижает, молоко свертывает, индол не образует. Антигенные свойства. Имеет обособленный вегетативный и спорный антигены. Штамм обладает стабильными свойствами и используется для получения биологических препаратов для профилактики и терапии европейского гнильца пчел.

Известные штаммы *Bacillus alvei*, обладающие сходными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами, по антигенной структуре не идентичны заявляемому штамму и не обладают присущим ему

свойству – продуцирования антигена вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (Герпесвируса-1).

Задача изобретения – изыскание продуцента антигена вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, позволяющего нарабатывать антиген, используя доступные дешевые питательные среды.

Поставленная задача решается использованием штамма *Bacillus alvei* – продуцента антигена герпесвируса – 1 (вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота) ИЭКВМ УААН № 413.

Сопоставительный анализ с прототипом позволяет сделать вывод, что заявляемый штамм отличается от известного новым свойством – продуцированием антигена герпесвируса-1 крупного рогатого скота, что соответствует критерию “новизна”. Это же свойство не обнаружено при анализе других известных штаммов *Bacillus alvei*, что позволяет сделать вывод о соответствии предлагаемого изобретения критерию “изобретательский уровень”.

Штамм *Bacillus alvei*-413 выделен из подмора пчел пасеки неблагополучной по инфекционным заболеваниям пчел, типирован бактериофагом Витебского ветеринарного института, депонирован в коллекции микроорганизмов Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины под номером 413.

Штамм *Bacillus alvei*-413 характеризуется следующими морфологическими, культуральными и биохимическими признаками.

Морфологические признаки. Крупные грамположительные палочки, длиной 2–5 мкм и шириной 0,5–0,8 мкм, эллиптической формы. Образуют овальные споры с остатками палочек на обоих концах, они шире палочек и часто расположены рядами. Отмечается раздутость спорангия, споры располагаются центрально и субтерминально. Размер спор 2,5–4,0 мкм в длину и 0,9–13,0 мкм в ширину. Строение и форма спор характерны. При электронной микроскопии клеточная стенка палочки трехслойная, до-

стигает толщины 170 Å. Цитоплазма имеет гранулярное строение. Споры пятиугольной формы с плотной гомогенной оболочкой (270 Å) и неравномерными выступами. Зона кортекса (330 Å) состоит из 7 слоев. В центре споры размещена спороплазма.

Культуральные и биохимические свойства. Факультативный аэроб, хорошо растет на обычных питательных средах (МПА–

МРБ), pH 7,2-7,4 при 35-37°C. Максимальная температура роста 40-45°C, минимальная 15-20°C. При росте на жидких питательных средах подвижность является непостоянным признаком (реакция варьирует). Разлагает глюкозу с образованием кислоты и ацетона без образования газа. При росте на средах с арабинозой, ксилитом и маннитом кислоту не образует. Растет на средах с 0,001% лизоцима и 5% хлористым натрием, расщепляет казеин и тирозин (непостоянно), проходит кокковидную стадию при культивировании в течение нескольких недель на среде содержащей сахар, желатину разжижает, свертывает и пептонизирует молоко, индола не образует, расщепляет глицерин, лактозу, сахарозу, мальтозу. Нитраты не восстанавливает, каталазоположителен, вызывает β -гемолиз.

Через 24 ч роста на МРБ вызывает помутнение среды с образованием слизистого осадка, сероватой нестабильной пленки, при встряхивании опадающей на дно. На МПА образует крупные разветвляющиеся колонии неправильной формы в виде "оленьих рогов" с блестящей поверхностью, иногда грязно-желтого цвета.

Способность *Bacillus alvei*-413 продуцировать антиген, родственный антигену герпесвируса-1 крупного рогатого скота, подтверждают опытом по истощению антител сывороток крови 15 телят, которые до и после истощения титруют антигенами: вирусной диареи крупного рогатого скота, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, микоплазм с помощью реакции непрямой агглютинации (РНА); парагриппа-3, рота- и коронавируса с помощью

реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) по общепринятой методике.

Штамм *Bacillus alvei* 413 выращивают на МПА в течение 24 ч, суточную культуру смывают физраствором pH 7,0-7,2, однократно отмывают физраствором и ресуспендируют в нем до концентрации 20 млрд м.т./мл. Полученную суспензию культуры смешивают с титрованными сыворотками в соотношении 1:9 и помещают в термостат на 2 часа при 37°C и на 12 часов при 4°C, после чего пробирки центрифугируют. Исходные сыворотки и пробы надосадочной жидкости титруют антигенами вирусной диареи крупного рогатого скота (ВД), инфекционного ринотрахеита (ИРТ), микоплазм в РНА, парагриппа-3 (ПГ-3), рота- и коронавируса в РЗГА.

Результаты опыта представлены в табл. 1.

Параллельно ставят опыт по истощению антител сывороток (с теми же сыворотками по описанной выше методике) с тремя штаммами *Bacillus alvei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Staphylococcus albus*. Результаты опыта представлены в табл. 2.

Таким образом, использование штамма бактерий *Bacillus alvei*-413 в качестве продуцента антигена герпесвируса-1 крупного рогатого скота позволяет значительно упростить способ производства и снизить себестоимость целевого продукта за счет использования доступных питательных сред по сравнению с использованием в качестве продуцента герпесвируса-1, требующего для культивирования культивируемых соматических клеток животных.

Таблица 1

Результаты опыта по истощению антител сывороток крови телят *Bacillus alvei*-413

№ животного	Титры антител до истощения						Титры антител после истощения					
	ВД	ИРТ	ПГ-3	Микоплазм	Ротавирус	Коронавирус	ВД	ИРТ	ПГ-3	Микоплазм	Ротавирус	Коронавирус
1	1:32	1:32	1:80	1:16	1:40	1:160	1:32	0	1:80	1:80	1:40	1:160
2	1:64	1:64	1:160	1:64	1:40	1:160	1:64	1:4	1:80	1:64	1:40	1:160
3	1:64	1:64	1:80	1:256	1:40	1:80	1:16	1:2	1:80	1:128	1:40	1:80
4	1:32	1:128	1:320	1:512	1:80	1:80	1:32	1:2	1:320	1:512	1:80	1:80
5	1:128	1:16	1:320	1:64	1:160	1:40	1:128	0	1:160	1:64	1:160	1:40
6	1:16	1:32	1:80	1:32	1:80	1:160	1:16	0	1:80	1:32	1:80	1:160
7	1:64	1:64	1:640	1:32	1:160	1:80	1:64	1:2	1:640	1:32	1:160	1:80
8	1:32	1:64	1:640	1:16	1:320	1:160	1:32	1:2	1:640	1:16	1:320	1:160
9	1:64	1:256	1:80	1:64	1:320	1:160	1:64	1:8	1:80	1:64	1:320	1:160
10	1:16	1:64	1:320	1:256	1:80	1:40	1:16	1:4	1:160	1:256	1:80	1:40
11	1:128	1:32	1:320	1:128	1:80	1:20	1:64	0	1:320	1:128	1:80	1:20
12	1:64	1:128	1:80	1:128	1:320	1:20	1:64	1:4	1:80	1:128	1:320	1:20
13	1:64	1:64	1:160	1:64	1:40	1:80	1:64	1:2	1:160	1:64	1:40	1:80
14	1:128	1:128	1:160	1:16	1:40	1:40	1:128	1:2	1:160	1:16	1:40	1:40
15	1:12	1:128	1:120	1:32	1:320	1:80	1:32	1:4	1:160	1:32	1:320	1:80

Таблиця 2

Опыт по истощению антител сывороток крови телят *Bacillus alvei*-413, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericum*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus alvei*-57 и ВГНКИ № 94/84

Название культуры	Титры антител до истощения				Титры антител после истощения			
	ИРТ	В.Д	ПГ-3	Мико-плазм.	ИРТ	В.Д	ПГ-3	Мико-плазм.
<i>Bacillus alvei</i> -413	1:256	1:32	1:320	1:32	1:4	1:32	1:320	1:32
	1:64	1:32	1:640	1:64	0	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	0	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:4	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	0	1:64	1:160	1:256
<i>Bacillus subtilis</i>	1:256	1:32	1:320	1:32	1:256	1:32	1:320	1:32
	1:64	1:32	1:640	1:64	1:64	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	1:32	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:128	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	1:64	1:64	1:160	1:256
<i>Bacillus mesentericum</i>	1:256	1:32	1:320	1:32	1:256	1:32	1:320	1:32
	1:64	1:32	1:640	1:64	1:64	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	1:32	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:128	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	1:64	1:64	1:160	1:256
<i>Staphylococcus albus</i>	1:256	1:32	1:320	1:32	1:256	1:32	1:320	1:320
	1:64	1:32	1:640	1:64	1:64	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	1:32	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:128	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	1:64	1:64	1:160	1:256
<i>Bacillus alvei</i> -57	1:256	1:32	1:320	1:32	1:256	1:32	1:320	1:32
	1:64	1:32	1:640	1:64	1:64	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	1:32	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:128	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	1:64	1:64	1:160	1:256
<i>Bacillus alvei</i> ВГНКИ № 94/84	1:256	1:32	1:320	1:32	1:256	1:32	1:320	1:32
	1:64	1:32	1:640	1:64	1:64	1:32	1:640	1:64
	1:32	1:128	1:320	1:256	1:32	1:128	1:320	1:256
	1:128	1:32	1:80	1:64	1:128	1:32	1:80	1:64
	1:64	1:64	1:160	1:256	1:64	1:64	1:160	1:256

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор О. Кравцова

Замовлення 4149

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101