



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 93374

(13) U

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 04858**

(22) Дата подання заявки: **07.05.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.09.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.09.2014, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Уховський Віталій Вікторович (UA),
Пискун Антон Володимирович (UA),
Кучерявенко Олександр Олександрович
(UA),
Дяченко Ганна Василівна (UA),
Куликова Влада Вячеславівна (UA),
Степна Олена Олександрівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)**

**(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ LEPTOSPIRA INTERROGANS HARDJOPRAJТНО СЕРОГРУПА SEJROE,
СЕРОВАР HARDJO ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ ЛЕПТОСПІРОЗУ
ТВАРИН ТА ДІАГНОСТИКУМІВ**

(57) Реферат:

Штам бактерій *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno сероприна Sejroe, серовар hardjo, задепонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за номером 356 для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин та діагностикумів.

UA 93374 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології і може бути використана для виготовлення діагностиків та вакцин проти лептоспірозу тварин, що є досить поширеним на тваринницьких фермах і завдає значних економічних збитків.

Серед штамів, що паразитують у великій рогатій худобі, найбільше значення на території України мають *L. Sejroe* (серовар *polonica*) та *L. Hebdomadis* (серовар *kabura*), дещо менша роль відводиться *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. Grippotyphosa*, *L. Tarassovi*, *L. Pomona* та *L. Canicola* [1]. У країнах західної Європи та США ці штами також викликають захворювання, проте основним збудником лептоспірозу вважається *L. Interrogans* серовар *hardjo*, серогрупа *Sejroe* [2].

У тварин, інфікованих сероваром *hardjo*, клінічні ознаки зазвичай мають неспецифічний характер і розвиваються у результаті ураження статевої системи тварини. Часто інфекція має прихований перебіг. Захворювання завжди супроводжується тривалим персистуванням збудника у нирках та його виділенням у навколишнє середовище із сечею. Відбувається зниження репродуктивних властивостей та молочної продуктивності тварин. У вагітних корів спостерігаються аборти із 4-го (у більшості випадків 7-го) місяця вагітності, мертвонародження, муміфікація плода, народження слабких, нежиттєздатних телят, характерним є синдром зниження молочної продуктивності, подовження сервіс-періоду у корів, затримання плодових оболонок, безпліддя. Для інфікованих сероваром *hardjo* корів є характерними спорадичні аборти, тоді як при зараженні іншими штамми (*L. Pomona*, *L. Grippotyphosa*) спостерігається синдром "абортів бурі" (масових абортів), що виникають на 2-3,4-6, 7-9 місяцях тільності (за даними різних авторів) [1,3].

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* (Авторське свідоцтво № 55664, 26.01.83; Авторське свідоцтво № 828459, 30.01.83), *Leptospira interrogans* PSR-1 серогрупа *Pomona* (RU 2 030 915 Cl, 20.03.1995), *Leptospira interrogans* bratislava серогрупа *Australis* (Авторське свідоцтво №22917, 25.04.2007) *Leptospira interrogans* "Рябухин" серогрупи *Icterohaemorrhagiae* сероеар *copenhageni* (RU 2 005 779 Cl, 15.01.1994), на основі яких виготовляють інактивовану полівалентну вакцину проти лептоспірозу.

Найближчим аналогом корисної моделі є виробничий штам *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа *Australis*, серовар *bratislava*, який використовується для виробництва інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин (Авторське свідоцтво №22917, 25.04.2007) [4]. Використання штаму бактерій *Leptospira interrogans* *Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo* 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* *Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo*, що має підвищену імуногенну активність, має стабільні морфологічні та культурально-біохімічні властивості, високу потенцію росту, яка сприяє отриманню великої кількості біомаси для виготовлення вакцин та діагностиків проти лептоспірозу.

Штам бактерій *Leptospira interrogans* *Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo* отриманий з Королівського тропічного інституту (м. Амстердам) в 1997 році, який клоновано та селекціоновано в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів Інституту ветеринарної медицини НААН.

Штам бактерій *Leptospira interrogans* *Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo* задепонований в колекції мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів 28.11.2005 року і має реєстраційний номер 356.

Морфологічні властивості. Суворий аероб. Оптимальна температура для культивування 28-30 °С. Грамнегативні спірохети. У темному полі мікроскопа мають вигляд матових тонких рухомих ниточок. Погано фарбуються аніліновими барвниками. Концентрація водневих іонів середовища для культивування 7,2-7,4 [5].

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 3-3,5 кг внутрішньовенно по 0,75 см³. Для проведення роботи був використаний вакцинний штам бактерій *Leptospira interrogans* *Hardjoprajtno* серогрупа *Sejroe*, серовар *hardjo*

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 дослідів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Титри антитіл в сироватках крові кролів імунізованих дослідними антигенами, $M \pm m$, $n=5$

Найменування штамів	Титри антитіл в сироватках крові кролів на день після вакцинації:		
	7	14	25
<i>Leptospira interrogans</i> Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo	1:79,7±6,4	1:351,4±18,5	1:590±27,3

5

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

Генетичні особливості штаму. Стійкий до дії фурациліну, 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 °С, а сироватка крові кролів - 30 хв. при температурі 56 °С. Адаптація штаму до середовищ з вмістом сироватки крові овець взамін середовища з вмістом сироватки крові кролів проводиться, згідно з розробленими способами 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, кролятах-сисунках і золотистих ховрашках. Визначена LD_{50} для золотистих ховрашків складає 2×10^4 мікробних тіл. Клінічне виявлення інфекції у експериментальних тварин характеризується жовтяницею видимих слизових оболонок, 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* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo в дозі, в декілька разів перевищуючи летальну, при 100 % загибелі не вакцинованих контрольних тварин.

Зі штаму *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo отримана вакцина, яка була випробувана в експерименті на тваринах.

Приклад 1.

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

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

Готовий вакцинний препарат вводили кролям (3-3,5 кг) в латеральну вену вуха в дозі $0,75 \text{ см}^3$.

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

45

Таблиця 2

Титри антитіл кролів у відповідь на застосування вакцини зі штаму бактерій *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo на 25 добу після застосування, M±m, n=9.

Назва штаму	Титри антитіл кролів
<i>Leptospira interrogans</i> Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo (штам з яким не проводились роботи по підвищенню імуногенної активності)	1:113±17
<i>Leptospira interrogans</i> Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo (клонований та селекціонований в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів IBM НААН)	1:365±87

Якщо проаналізувати дані таблиці, то можна зробити висновок, що вакцина, до складу якої входить антиген штаму *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo (клонований та селекціонований в лабораторії лептоспірозу сільськогосподарських тварин з музеєм штамів мікроорганізмів IBM НААН), що пройшов цикл підвищення антигенної та імуногенної активності, виявився у 3,23 рази більш імуногенним з високим ступенем достовірності ($P < 0,005$), ніж *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo (штам з яким не проводились роботи по підвищенню імуногенної активності (вихідний штам)).

Приклад 2.

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

Джерела інформації:

1. Хронічні інфекційні хвороби тварин / Л.Є. Корнієнко [та ін.]. - Біла Церква, 2009. - 291 с.
2. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States / D.A. Miller [et al.] // American Journal of Veterinary Research. - 1991. - Vol. 52. - P. 1761-1765.
3. Bovine leptospirosis: experimental serovar hardjo infection / W.A. Ellis [et al.] // Veterinary Microbiology - 1986. - Vol. 11. - P. 293-299.
4. Декларац. пат. України на корисну модель 200700569 Україна, МнКC12N1/20.A61K39/02. Штам бактерій *Leptospira interrogans* Yez bratislava серогрупа Australis, серовар bratislava для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин та діагностикумів / О-й.О. Кучерявенко, О-р.О. Кучерявенко, В.А. Піотрович, В.О. Волинець, В.В. Уховський, Г.В. Дяченко, Т.О. Дяченко, Г.К. Майорова, М.М. Піотрович. - № 22917; заявл. 22.01.2007; опубл. 25.04.2007; бюл. № 5-7 с.
5. Ленартович Л.С. Ранняя диагностика лептоспироза / Л.С. Ленартович// Тез. докл. научн. - практ. конф. по борьбе с зоонозными инфекциями. - Черновцы, 1985. - С. 53-54.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам бактерій *Leptospira interrogans* Hardjoprajtno серогрупа Sejroe, серовар hardjo, задепонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за номером 356 для виготовлення інактивованої вакцини проти лептоспірозу тварин та діагностикумів.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601