



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **159891** (13) **U**
(51) МПК
G01N 1/02 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2024 05715</p> <p>(22) Дата подання заявки: 03.12.2024</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 17.07.2025</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 16.07.2025, Бюл.№ 29</p>	<p>(72) Винахідник(и): Палій Анатолій Павлович (UA), Сосницький Олександр Іванович (UA), Зажарський Володимир Володимирович (UA), Сосницька Альона Олександрівна (UA), Бібен Іван Андрійович (UA), Зажарська Надія Миколаївна (UA), Павліченко Олена Володимирівна (UA), Ващик Євгенія Володимирівна (UA), Коваленко Лариса Володимирівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Григорія Сковороди, 83, м. Харків, 61023 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ШТАМУ - ПРОБІЙНИКА P-24 PASTEURELLA MULTOCIDA SUBS. SEPTICA ДЛЯ ПРЯМОГО КОНТРОЛЬНОГО ЗАРАЖЕННЯ ТА ВИГОТОВЛЕННЯ ДЕВІТАЛІЗОВАНОГО АНТИГЕНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання штаму-пробійника P-24 Pasteurella multocida subs. septica для прямого контрольного зараження та виготовлення девіталізованого комплексного цільноклітинного антигену включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей Pasteurella multocida subs. septica. При цьому ізоляцію бактерій проводять з крові серця тварин в атональному стані, клонують культуру Pasteurella multocida subs. septica в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} для відбору поодиноких колоній та інкубують протягом 48 годин на елективному поживному середовищі.

UA 159891 U

Корисна модель належить до ветеринарної мікробіології, біотехнології, зокрема стосується ізоляції збудника та підбору виробничого штаму-пробійника P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* серовар В, який може використовуватись для прямого контрольного зараження та виготовлення девіталізованого комплексного цільноклітинного антигену в складі моно- або

5 полівалентних протипастерельозних ад'ювантвакцин.

Пастерельоз - це широко розповсюджена небезпечна бактеріальна зоонозна інфектопатологія, яка спричиняє значні економічні збитки. Пастерельозна інфекція викликається *Pasteurella multocida* сероварів А, В, D, F - які опосередковують поліпатогенний симптомокомплекс, від летального сепсису до хронічного пневмоентериту.

10 Відомо епізоотичний штам № 656 *Pasteurella multocida* subs. *septica*, який використовується для виготовлення девіталізованого бактерійного антигену у складі протипастерельозної полівалентної вакцини і має виражені протективні властивості у складі протипастерельозної вакцини на території колишнього СРСР (Патент на корисну модель № 7023 UA, МПК А61К 39/102. Спосіб виготовлення емульсійної протипастерельозної вакцини, опубл. 15.06.05, Бюл. №6. - 4 с.) В господарствах України циркулюють інші за детермінантами специфічності соматичного антигену епізоотичні сероваріанти пастерелл, що обумовлює незадовільні протективні властивості біопрепарату на теренах України.

20 Найближчим аналогом корисної моделі є епізоотичний штам № 31 *Pasteurella multocida* subs. *septica* (Патент на корисну модель UA № 7438 МПК С12N 1/20 Епізоотичний штам № 31 *Pasteurella multocida* серовар В для виготовлення вакцини проти факторного (ендогенного) пастерельозу телят і поросят, емульсійної інактивованої опубл. 15.06.05, Бюл. №6.- 4 с.), який одержують за допомогою відбору, висіву клонів і використовують для виготовлення девіталізованого антигену у складі протипастерельозної полівалентної інактивованої вакцини проти факторного (ендогенного) пастерельозу телят і поросят. Це рішення прийняте як

25 найближчий аналог. Недоліком цього штаму є те, що він має незадовільну ступінь антигенної спорідненості з епізоотичними клонами, циркулюючими на теренах України в останні роки, дисоціативні ознаки зниження показників вірулентності та малоефективні репродуктивні потенції, а також в короткий термін не забезпечує накопичення захисних антитіл у вакцинованих тварин.

30 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання штаму-пробійника P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* серовар В для прямого контрольного зараження та виготовлення девіталізованого комплексного цільноклітинного антигену в складі моно- або полівалентних протипастерельозних ад'ювантвакцин, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на елективні середовища, інкубацію, визначення базисних властивостей культури *Pasteurella multocida* subs. *septica* шляхом ізоляції бактерій з крові серця тварин в агональному стані, клонування культур *Pasteurella multocida* subs. *septica* в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} , шляхом інкубації протягом 48 годин в МПБ на ОПХ, щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконують таким чином.

40 Для одержання стабільного і біологічно повноцінного штаму-пробійника P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* серовар В проводять його через організм тварин (лабораторних або сільськогосподарських) і одержують з крові серця агонізуючих тварин оновлену культуру збудника посівом крові в МПБ на ОПХ. Після дводобової інкубації висівають чисту культуру в чашки Петрі з агаром Хотінгера у розведеннях від 10^{-1} до 10^{-10} , інкубують за 37-38 °С впродовж

45 48 годин і отримують ізольовані колонії. На чашках Петрі з розведенням від 10^{-1} до 10^{-8} спостерігався зливний ріст бактерій, тобто кількість колоній перевищувала 300 колоній на одну чашку Петрі. З кожної чашки Петрі з розведення 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} відбирають по два клони штаму та культивують за температури 37-38 °С на агарі Хотінгера в чашках Петрі впродовж 48 годин. Після цього вивчають їх тинкторіальні, морфологічні, культуральні, біохімічні і біологічні властивості. В ході дослідження в окремих випадках спостерігають дисоціацію культур, які мають вигляд поліморфних клітин різної величини та характеризуються ростом гетерологічних колоній. З загальної кількості отриманих клонів були відібрані гомогенні культури, що мали однакові морфологічні ознаки: дрібні грамнегативні нерухомі капсульні кокобактерії, які не утворювали спор.

50 Епізоотичний штам P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* є збудником пастерельозу ссавців (емерджентна форма) та характеризується наступними властивостями.

Морфо-тинкторіальні властивості: у препаратах-мазках з добових культур, пофарбованих за Грамом, пастерели мають вигляд дрібних коко-бактерій рожево-червоного кольору, розташованих поодинокі, парно, короткими ланцюжками. При фарбуванні за Бурі-Гінсом, виявляється капсула, що не фарбується. У препаратах-відбитках з внутрішніх органів

інфікованих тварин, хворих на пастерельоз, при фарбуванні за Романовським-Гімза або за Міхіним виявляються поліморфні біполярні бактеріальні клітини, значно більші за бульйонних культур.

5 Культуральні властивості: пастерели є швидкозростаючими факультативно-анаеробними мезофільними прокариотами. На м'ясопептонових бульйоні (МПБ) і агарі (МПА) пастерели ростуть в S-формі, на кров'яному МПА - ростуть в M-формі. Елективними живильними середовищами є МПБ на ОПХ (основі перевару Хотінгеру) та 5 % кров'яний МПА.

10 В МПБ пастерели в першу добу культивування викликають незначне, ледь помітне помутніння - "опалесценцію", на 2-3 добу помутніння стає більш помітним і при струшуванні спостерігається феномен "муарові хвилі", на 3-4 добу випадає слизуватий осад, при струшуванні якого виникає "кіска", надосад прозорий.

На МПА пастерели в першу добу культивування формують дрібні прозорі "росинчаті" колонії, що флуоресціюють при косому освітленні, в подальшому - колонії збільшуються у розмірі і мутніють при старінні.

15 На 5 % кров'яному МПА пастерели формують масивні слизуваті непрозорі зеленувато-коричневі колонії без зони гемолізу.

На агарі Мак-Конкі пастерели не росли.

20 Біохімічні властивості: пастерели ферментують глюкозу, сахарозу, декстрозу, фруктозу, галактозу і маніт до утворення кислоти без газу; - не ферментують ксилозу, трегалозу, сорбіт, дульцит, лактозу, мальтозу, рамнозу, арабінозу і рафінозу; - не згортають молоко, не розріджують желатин; - виділяють сірководень та індол, відновлюють нітрати до нітритів, реакції з метиловим червоним і Фогеса-Проскауера - негативні.

25 Біологічні властивості: епізоотичний штам P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* є патогенним і високовірулентним для ссавців. Кількісні характеристики вірулентності визначали за формулою Кербера в модифікації Ашмаріна. Для лабораторних тварин LD₅₀ за довірчого інтервалу з рівнем значущості оцінок $\alpha \leq 0,05$ % становить наступні значення:

- для білих мишей живою вагою 18-20 г, при підшкірному зараженні, LD₅₀=2,6 < 9,4 < 32,7 КУО;

30 - для мурчаків живою вагою 220-250 г, при зараженні в ділянці паху LD₅₀=1,6 × 10⁵ < 5,7 × 10⁵ < 2,4 × 10⁶ < КУО;

- для кролів живою вагою 2,0-2,5 кг, при внутрішньом'язовому зараженні, LD₅₀=2,6 < 9,4 < 32,7 КУО;

- для підсвинків живою вагою 20,0-25,0 кг, при внутрішньом'язовому зараженні (в ділянці вуха) LD₅₀=68±9 КУО;

35 - для телят, при внутрішньом'язовому зараженні (в ділянці середньої третини шиї), живою вагою 60,0-70,0 кг LD₅₀=72±12 КУО;

- для курчат 90-120 денного віку культура виявилась апатогенною. Стабільність основних властивостей штаму: пастерели зберігають

40 вихідні властивості при ліофілізації в протективному середовищі або в м'ясопептонному напіврідкому агарі (МПНА) в умовах рефрижератору при + (4-6)° С протягом 5±1 місяців (термін спостереження).

Патогенність штаму: підтримують шляхом періодичного пасажування на лабораторних тваринах (білих мишах або кроликах) з подальшою реізоляцією з крові серця на простих живильних середовищах.

45 Стабільність генетичних властивостей: у штаму при періодичних пересівах на МПНА, дисоціація не спостерігається протягом 12 місяців (термін спостереження).

Підтримання та освіжиння штаму: пересіви на МПНА і недовготривале збереження при + (4-6)°С, з наступним проведенням через організм лабораторних тварин або посів на 5 % кров'яний МПА.

50 Основні умови зберігання: пересіви через кожні 4 місяці на МПНА і зберігання при + (4-6)° С або ліофілізація.

Штам вільний від інших мікроорганізмів та грибів.

55 Штам належить до типу *Proteobacteria*, класу *GammaProteobacteria*, порядку *Enterobacteriales*, родини *Pasteurellaceae*, роду *Pasteurella*, виду *Pasteurella multocida*, підвиду *Pasteurella multocida* subs. *septica*, серовару В.

Штам-пробійник P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* серовар В був виділений з крові серця агонізуючого підсвинку з септичною формою пастерельозу в одному з приватних господарств Дніпропетровської області і депонований в музеї навчально-наукової лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин Дніпровського ДАЕУ.

60 Приклад 1.

Використання штаму P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* як гомологічного або гетерологічного штаму-пробійника при імунологічних дослідженнях.

Штам P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* як штам-пробійник проти гомологічного або гетерологічного антигену накопичують проведенням через лабораторних тварин (білих мишей, кролів) або 5 % кров'яний МПА бактерійну культуру, встановлюють накопичення прокариот в робочій суспензії у вигляді КУО/НВЧ на елективних живильних середовищах і за формулою Спірмена-Кербера-Ашмаріна визначають LD₅₀ для відповідних біологічних моделей, на яких будуть проводити пряме контрольне зараження. Отримавши всі необхідні попередні характеристики бактеріальної суспензії збудника, проводять відповідні імунологічні дослідження.

Приклад 2.

При виготовленні цільноклітинного бактеріального інактивованого антигену бактеріальну масу *Pasteurella multocida* subs. *septica* P-24 накопичують при культивуванні на елективному живильному середовищі (МПБ на основі перевару Хотингеру), стаціонарно або в ферментерах в до досягнення максимального накопичення ($\geq 9,0 \text{ lg НВЧ/см}^3$) і додають хімічний інактивант (4-5 % димер етіленіміну за АДР або інший інактивант) і витримують 10-12 годин при $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ з періодичним перемішуванням. Для отримання інактивованої бакмаси збудника суспензію прокариот центрифугують при охолодженні до $+ (4-6)^\circ\text{C}$ протягом 30-40 хвилин за 4-5 тис. обертів/хв. Надосад видаляють, осад з інактованим пастерельозним цільноклітинним антигеном ресуспендують у стерильному фізіологічному розчині і використовують за призначенням.

Таким чином, штам *Pasteurella multocida* subs. *septica* P-24 отриманий таким способом є стабільним та має високу антигенну та імуногенну активність.

25 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання штаму-пробійника P-24 *Pasteurella multocida* subs. *septica* для прямого контрольного зараження та виготовлення девіталізованого комплексного цільноклітинного антигену, що включає накопичення бактеріальної маси, відбір клонів, висів клонів на поживне середовище, інкубацію, визначення властивостей *Pasteurella multocida* subs. *septica*, який **відрізняється** тим, що ізоляцію бактерій проводять з крові серця тварин в атональному стані, клонують культуру *Pasteurella multocida* subs. *septica* в розведенні від 10^{-1} до 10^{-8} для відбору поодиноких колоній та інкубують протягом 48 годин на елективному поживному середовищі.