



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **55**

(51) **C 12 N 1/00, A 61 K 39/00**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

(21) 0600064

(22) 15.09.2006

(46) Бюл.44 (4), 2006

(71)(72)(73) Мирзоев Д.М. (ТJ); Каримов Б. (ТJ);
Назаров С.К. (ТJ)

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БИВАЛЕНТНОЙ
ГИДРООКИСЬАЛЮМИНИЕВОЙ ФОРМОЛ-
ВАКЦИНЫ ИЗ МЕСТНЫХ ШТАММОВ ПАСТЕ-
РЕЛЛЫ ДЛЯ МЕЛКОГО РОГАТОГО СКОТА

(57) Способ изготовления бивалентной гидро-
окисьалюминиевой формолвакцины из местных

штаммов пастереллы для мелкого рогатого скота относится к ветеринарной медицине, а именно к изготовлению вакцины из ассоциированных местных штаммов пастереллы (*Pasteurella*).

Ассоциацию шести штаммов пастереллы в течение 18 суток в термостате при $t\ 38^{\circ}\text{C}$, при которой посев очищенной чистой культуры пастереллы пересеивают в мясо-пептонный бульон. Добавляют 3 % - раствор формалина, А1ОН и пересеивают на мясо-пептонный агар.

Изобретение относится к ветеринарной медицине, а именно к изготовлению вакцины из ассоциированных местных штаммов пастереллы (*Pasteurella*) применяющихся в ветеринарии для профилактики пастереллеза мелкого рогатого скота.

Целью изобретения является разработка новой более подходящей вакцины из местных штаммов пастереллы для профилактики мелкого рогатого скота.

Поставленная цель была достигнута на основе изучения выявленных штаммов. При изучении штаммов использовано следующее:

1. Культурально-морфологические свойства.

Для изучения культурального свойства использовали питательные среды МПА (мясо-пептонный агар), МПБ (мясо-пептонный бульон), а для морфологической характеристики - метод окраски мазков по Грамму и Романовскому Гимзы.

2. Биологическую характеристику изучали путем введения изучаемого штамма белым мышам, кроликам и овцам.

3. Маркерная характеристика:

а) иммунологические свойства изучали после приготовления вакцины из этого штамма и вакцинации подопытных животных. По истечении 14 суток, вводили лабораторным животным чистую культуру вышеуказанного штамма;

б) биохимические свойства выделенного штамма изучали в среде Гиса (группа сахаров).

4. Биотехнологическая характеристика - название и свойства полезного штамма.

5. Вирулентная характеристика:

а) вирулентность определяли путем введения культуры штамма белым мышам и кроликам;

б) чувствительность к антибиотикам - путем посева культуры на чашках Петри с МПА, с дисками, пропитанными антибиотиками;

6. Признаки штаммов культур пастереллы:

а) родословная культуры;

б) проведено 6 пассажей с целью определения стабильности выделенных смесей, ассоциированных штаммов пастереллы;

в) ростовая характеристика (выращивание культуры) - проводили по стандартным общепринятым условиям;

г) культуральные свойства и рост изучали путем посева исследуемого материала на питательной среде МПА и МПБ;

д) культивирование исследуемого материала проводили на белых мышах, кроликах и овцах.

Изобретение позволяет провести профилактику против пастереллеза, выявлять штаммы и своевременно проводить вакцинацию из того же вида штамма вакцины, а также определять по регионам вспышки пастереллеза и вид штамма.

С этой целью на базе Таджикского научно-исследовательского ветеринарного института (ТаджНИВИ) выведена чистая культура пастереллы:

-от трех голов вынужденно забитых ярок;

- от двух голов вынужденно забитых козوماتок;

- от шести голов мертворожденных ягнят;

- от одной головы вынужденно забитой ярочки;

- от двух вынужденно забитых овцематок.

Исследование патологических материалов от всех вышеперечисленных животных проводилось согласно общепринятой методике по проведению бактериологических исследований.

Для микроскопического исследования мазки-отпечатки окрашивали по методу Грамма и Романовского Гимзы. В мазках-отпечатках, окрашенных по методу Грамма, обнаружили овоидные, однородные, грамтрицательные палочки без посторонних микрофлор. В мазках-отпечатках, окрашенных по методу Романовского Гимзы, обнаружили овоидные, однородные, биполярные палочки без посторонних микрофлор.

Для получения роста пастереллы и выделения чистой культуры использовали питательные среды МПБ и МПА чисто фабричного изготовления. На МПА выросли мелкие, нежные, прозрачно-голубоватые, опалесцирующие ровными краями (5 форма) колонии. На МПБ - равномерное помутнение со слизистым осадком.

При микроскопическом исследовании изолированных колоний в МПА, также в МПБ, окрашенных по Грамму, обнаружены однородные, овоидные и кокковидные формы, грамтрицательные палочки без посторонних микрофлор.

Для изучения биохимических свойств, выделенных штаммов пастереллы, использовали среду Гиса. Получен рост пастереллы с образованием кислоты (к) без газа на глюкозе, лактозе, маните, сахарозе, сероводороде и индоле.

Для определения вирулентности выделенного штамма, использовали белых мышей и кроликов.

Изучение каждого штамма проводилось по отдельности. После этого все шесть штаммов пастереллы, выделенных из разных регионов, ассоциировали вместе и получили смесь морфологических, культуральных, биохимических и биологически однородных пастерелл.

С целью определения стабильности выделенных смесей, ассоциированных штаммов пастереллы, провели шесть пассажей. В том числе, пять - на белых мышах, по десять в каждом пассаже и пассаж - на шести головах ярок 2 - 3-х месячного возраста.

Во всех случаях изучались клинические признаки заболевания и патологоанатомические изменения внутренних органов павших белых мышей, кроликов и ярок.

Результаты исследования показали, что по завершении шести пассажей с продолжительностью в 28 суток, выделенные смеси штаммов пастереллы являются стабильными, однородными без уча-

ствия посторонних микрофлор и патогенными для белых мышей, кроликов и ярочек.

Изобретение позволяет оккупировать вспышку пастереллеза мелкого рогатого скота, сократить заболевание до минимума и повысить процент сохранности поголовья овец и коз. И использовать в целях профилактики, где идет вспышка.

После получения результатов исследования по стабильности выделенных штаммов, приступили к изготовлению первой партии вакцины из смеси ассоциированных местных штаммов пастереллы.

Производство вакцины против пастереллеза для овец и коз из ассоциированных местных штаммов осуществлялось из расчета компонентов на 1 литр вакцины.

Пример 1.

1-е сутки - посев очищенной чистой культуры пастереллы в 2-х пробирках с МПБ помешают в термостат при температуре 38 °С на 5-6 часов. По истечении этого времени, содержимое пробирки (40 мл) пересеевают на флакон с МПБ и держат в термостате в течение 14 часов;

2-е сутки. По истечении 14 часов, содержимое флакона (40 мл) пересеевают на 1 литр МПБ (4%-й исходный материал) и держат в термостате в течение 36 часов (2 - 3-и сутки);

4-е сутки. По истечении 36 часов, определяют, по стандарту, мутность - наличие микробных тел. В одном кубике (1 мл), изготавливаемой вакцины, она равнялась 4 млрд. микробных тел. После чего добавляют 3 % - ый раствор формалина из расчета 10 мл на 1 л и держат в термостате 2-ое суток (5-6-ой день);

7-е сутки. По истечении 2-х суток, путем посева массы на МПА, МПБ, Китт-Тароци и среду Сабурро проверяют на стерильность. После этого, сразу в массу добавляют 10 г жидкую гидроокись алюминия (AlOH) и 2-ое суток держат в термостате (7-8-ые сутки);

9-е сутки. По истечении 8-ых суток, путем посева массы на МПА, МПБ, Китт-Тароци, проверяют на стерильность и трое суток держат в термостате (9-10-11-ые сутки),

12-е сутки, из пробирок с МПБ по 0,3 мл пересеевают на МПА и держат в термостате 7 суток (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18-ые сутки);

19-е сутки. Из полученной массы, путем введения подопытным животным вакцины проверяют безвредность вакцины.

Десяти белым мышам вводили по 0,3 мл подкожно в область живота. Четырем морским свинкам - по 1 мл подкожно в область живота и четырем кроликам - по 3 мл подкожно в область внутренней поверхности бедра.

За привитыми животными наблюдали 10 дней (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28-ые сутки). В течение этого времени привитые животные были

клинически здоровы и случаи смертности не наблюдались. Вакцина оказалась безвредной;

29-ые сутки. Проверялась активность и иммуногенность вакцины у привитых животных. Для полного создания иммунитета у привитых животных, наблюдали еще 10 суток (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38-ые сутки). На 21-ые сутки, после вакцинации, привитых животных (10 белых мышей, 4 морские свинки и 4 кролика) и пятерых не привитых белых мышей (контрольные) заразили суточной 3 -х млрд. взвесью культуры пастереллы. По 0,3 мл вводили подкожно в область живота и наблюдали 10 суток [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49-ые сутки). На 2-3-и сутки после заражения не вакцинированные белые мыши заболели и пали (при микроскопии у них были обнаружены овоидные, биполярные палочки). Вакцинированные животные в течение 10 суток после заражения, остались клинически здоровыми. Вакцина оказалась активной иммуногенной.

Пример 2.

Производственное испытание вакцины проводили на овцеферме с поголовьем в 1320 голов, где была вспышка пастереллеза. Клинически больные животные были изолированы для проведения лечебного мероприятия. Остальным клинически здоровым животным вводили вакцину, изготовленную из ассоциированных местных штаммов пастереллы. Пять голов ярочек не вакцинировали, оставили как контрольные. По истечении 10 суток провели вторую вакцинацию. Случаи заболевания и падежа скота после ревакцинации прекратились. Из общего поголовья вакцинированных животных на 2-ые, 3-и сутки после вакцинации, выявлено, что у 6 голов ярочек болезнь в инкубационном периоде. Из 5 голов не вакцинированных (контрольных) ярочек трое заболели пастереллезом (с явным клиническим проявлением).

Болезнь является сезонной, поэтому потребность неблагополучных хозяйств в профилактике заболевания пастереллеза очень высока.

Таким образом, результаты экспериментальных и производственных испытаний показали, что вакцина, изготовленная из ассоциации местных штаммов пастереллы, является безвредной и иммуногенной. В результате неоднократного пассажа разного вида животных, организмы у них стали более вирулентными и адаптированными к условиям наших регионов.

Результаты испытаний показали, что применение разработанной вакцины позволяет предупредить заболевание мелкого рогатого скота пастереллезом и повысить сохранность овец и коз до 100 %.

Предлагаемая вакцина для профилактики мелкого рогатого скота более иммуногенная и безвредная, может своевременно снизить заболеваемость пастереллезом.

Формула изобретения

Способ изготовления бивалентной гидро-окисьалюминиевой формолвакцины из местных штаммов пастереллы для мелкого рогатого скота, включающий ассоциацию шести штаммов пастереллы в течение 18 суток в термостате при $t\ 38^0\text{C}$,

при которой посев очищенной чистой культуры пастереллы пересеивают в мясо-пептонный бульон, добавляют 3 %-ый раствор формалина, АЮН и пересеивают на мясо-пептонный агар.

Компьютерный набор: Эшонхонова И.А.

Заказ	Тираж	Подписное
Национальный патентно-информационный центр РТ		
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14 а.		

ПАО НПИЦентра, 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14 а.