



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58875 (13) A

(51) 7 A61K39/114

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ВАКЦИННИЙ ШТАМ FUSOBACTERIUM NECROPHORUM-K

1

2

(21) 2002119091

(22) 15 11 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Риженко Василь Петрович, Дементьєва
Світлана Авксентівна, Марченко Олександра Ми-
колаївна, Галка Ігор Васильович(73) Риженко Василь Петрович, Дементьєва
Світлана Авксентівна, Марченко Олександра Ми-
колаївна, Галка Ігор Васильович(57) Штам *Fusobacterium necrophorum*-K, який де-
понований в колекції мікроорганізмів Державного

науково-контрольного інституту біотехнології і
штамів мікроорганізмів і має реєстраційний номер
142 від 05 08 2002 року, використовується для
виробництва інактивованої асоційованої вакцини
проти некробактеріозу сільськогосподарських тва-
рин, володіє стабільними морфологічними та
культурано-біохімічними властивостями і викли-
кає 100%-ну загибель білих мишей при
підшкірному введенні в дозі 0,5 см³ та концентрації
мікробних клітин 6,6x10¹²

Винахід відноситься до ветеринарної мікроби-
ології, зокрема, до нового штаму анаеробного мік-
роорганізму, що використовується для виготов-
лення вакцини проти некробактеріозу сільськогос-
подарських тварин

Аналогом винаходу є лабораторний штам *Fu-
sobacterium necrophorum* BN-2, що був використа-
ний для виготовлення анатоксин-вакцини проти
некробактеріозу [2]. До недоліків даного штаму
мікроорганізму можна віднести те, що він викори-
стовується для виділення токсину при виробництві
анатоксин-вакцини, а профілактичний ефект такої
вакцини невисокий - 33,3% [3].

Прототипом винаходу є колекційний штам *Fu-
sobacterium necrophorum* 2030A, що зберігається в
колекції кафедри епізоотології та інфекційних хво-
роб Московської Державної академії ветеринарної
медицини та біотехнології (м. Москва) [4].

Подібними ознаками прототипу із заявленим
штамом є те, що він високо токсигенний та пато-
генний для білих мишей і при культивуванні на
кров'яному агарі викликає гемолиз еритроцитів, а
також володіє подібними морфологічними та куль-
турально-біохімічними властивостями.

Подібним також є те, що цей штам використо-
вується для виробництва інактивованої асоційова-
ної вакцини проти некробактеріозу великої рогатої
худоби - "Нековак" [4].

Відмінними ознаками прототипу від заявлено-
го штаму є такі:

- штам задепонований в колекції мікроорганізмів
Російської Федерації і на Україні даного штаму
мікроорганізму немає,

- для виробництва вакцини використовується
штамів мікроорганізмів і має реєстраційний номер
142 від 05 08 2002 року, використовується для
виробництва інактивованої асоційованої вакцини
проти некробактеріозу сільськогосподарських тва-
рин, володіє стабільними морфологічними та
культурано-біохімічними властивостями і викли-
кає 100%-ну загибель білих мишей при
підшкірному введенні в дозі 0,5 см³ та концентрації
мікробних клітин 6,6x10¹²

- вакцина "Нековак", компонентом якої є анти-
ген із штаму, що взятий за прототип, не завжди
має бажаний ефект при вакцинації великої рогатої
худоби і не забезпечує високої імуногенності у
щепленого поголів'я [2].

Метою даного винаходу є вакцинний штам *Fu-
sobacterium necrophorum* - K ("Київський"), який
володіє стабільними морфологічними, культурано-
біохімічними та добре вираженими патоген-
ними властивостями і виділений з матеріалу віді-
браного від великої рогатої худоби з ознаками не-
кробактеріозу в одному із господарств Київської
області.

Штам *Fusobacterium necrophorum* - K, отрима-
ний шляхом культивування ізоляту з уражених
ділянок дистальних відділів кінцівок великої рога-
тої худоби, співробітниками лабораторії анаероб-
них інфекцій ІВМ УААН.

Штам *Fusobacterium necrophorum* K депонова-
ний в колекції мікроорганізмів Державного науко-
во-контрольного інституту біотехнології і штамів
мікроорганізмів і має реєстраційний номер 142 від
05 08 2002р.

Морфологічні властивості. У мазках із буль-
йонних та агарових культур, штам *Fusobacterium
necrophorum* - K має вигляд коротких ниток, рідше
поодинокі розміщені палички. Бактерія за Гра-
мом фарбується негативно, спор та капсул не
утворює. При фарбуванні за Муромцевим, має
вигляд тонких нитчастих форм з чітко вираженою

(13) A

(11) 58875

(19) UA

мілкою зернистістю

Культуральні властивості При культивуванні на середовищі Кітта-Тароцці (рН = 7,4±0,2, оптимальна температура 37±1,0 °C), ріст штаму *Fusobacterium necrophorum* - К проявляється вже через 24-36 годин, при цьому ріст супроводжується утворенням рівномірного помутніння та газу, що має неприємний гнилісний запах. При подальшому культивуванні утворюється пухкий осад на шматочках печінки.

На кров'яному та глюкозо-сироватковому агарі штаму *Fusobacterium necrophorum* - К утворює дрібні росинчасті колонії до 1мм в діаметрі, котрі через 4-5 діб стають добре видимими сірувато-білого кольору з рівними краями. На кров'яному агарі утворює зону гемолізу.

Ферментативні властивості Штаму *Fusobacterium necrophorum* - К ферментує з утворенням кислоти і газу глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, не ферментує фруктозу, маніт, дульцит. Утворює індоп та сірководень.

Таблиця 1

Біохімічні властивості
штаму *Fusobacterium necrophorum* - К

Глюкоза	+
Мальтоза	+
Фруктоза	-
Галактоза	+
Сахароза	+
Маніт	-
Дульцит	-
Утворення індопу	+
Утворення сірководню	+

Патогенні властивості Штаму *Fusobacterium necrophorum* - К має виражені патогенні властивості для великої рогатої худоби, кролів та білих мишей. У кролів на 4-5 добу при підшкірному введенні в дозі 1,0 см³ викликає некроз на місці ін'єкції та загибель тварин на 7-9 добу. Викликає 100%-ну загибель білих мишей в дозі 0,5 см³ та концентрацією мікробних клітин 6,6х10¹². Стабільність вірулентності встановлена шляхом 5-ти кратних пасажів через організм білих мишей та лабораторних спостережень на протязі кількох років.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1 Штаму *Fusobacterium necrophorum* - К (культура 1), отриманий шляхом культивування ізоляту з уражених ділянок дистальних відділів кінцівок великої рогатої худоби, відселекційований, як такий, що володіє характерними для роду *Fusobacterium*, родини *Bacteroidaceae* морфологічними та культурально-біохімічними властивостями. Був патогенним для білих мишей, оскільки при підшкірному та внутрішньочеревному введенні двохдобової бульйонної культури в дозі 0,5 см³ по 10 тварин на кожне введення, гинуло 90-100% тварин при 100% збереженні у контролі.

Приклад 2 Штаму *Fusobacterium necrophorum* - К (культура 2), отриманий шляхом культивування ізоляту з уражених ділянок печінки великої рогатої худоби, що володіє характерними для роду *Fusobacterium*, родини *Bacteroidaceae* морфологічними та культурально-біохімічними властивостями, але був слабо патогенним для білих мишей, оскільки при підшкірному та внутрішньочеревному введенні бульйонної культури в дозі 0,5 см³ по 10 тварин на кожне введення, гинуло 10-20% тварин при 100% збереженні у контролі.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика властивостей прототипу та штамів *Fusobacterium necrophorum*

Штами	Морфологія		Термін культивування штаму	Гемоліз еритроцитів	Наявність токсину	Патогенність для білих мишей
	Н	П				
F <i>necrophorum</i> 2030	-	+	2 доби	+	+	9/10
F <i>necrophorum</i> - К (культура 1)	+	±	7 діб	+	+	10/10
F <i>necrophorum</i> - К (культура 2)	-	+	7 діб	-	+	2/10
F <i>necrophorum</i> - К (культура 3)	-	+	7 діб	-	+	4/10

Примітка Н - нитчаста форма, П - поліморфна форма

Приклад 3 Штаму *Fusobacterium necrophorum* - К (культура 3), отриманий шляхом культивування ізоляту з уражених легень великої рогатої худоби, що володіє характерними для роду *Fusobacterium*, родини *Bacteroidaceae* морфологічними та культурально-біохімічними властивостями, але був слабо патогенним для білих мишей, оскільки при підшкірному та внутрішньочеревному введенні бульйонної культури в дозі 0,5 см³ по 10 тварин на кожне введення, гинуло 30-40% тварин при 100% збереженні у контролі.

Порівняльна характеристика властивостей прототипу та випробуваних і вищезазначених прикладів наведені в таблиці 2.

Імуногенні властивості Із штаму *Fusobacterium necrophorum* - К була виготовлена моновакцина для встановлення імуногенності штаму у дослідках на білих мишах та кролях. Лабораторних тварин щепили підшкіряно двічі з інтервалом 14 діб у дозах білих мишей по 0,5 см³, кролів по 1,0 см³ з концентрацією мікробних клітин 4 млрд м.к./см³. На 10-ту добу після другого щеплення провели

гостре зараження дослідних та контрольних (не щеплених) тварин бульйонною культурою штаму *Fusobacterium necrophorum* - К в дозі 0,5 см³ та концентрацією мікробних клітин $8,6 \times 10^{12}$. Тварини із дослідної групи залишилися живими у порівнянні

із 100%-вою загибеллю в контролі. Титри антитіл у сироватці крові кролів, щеплених моновакциною із штаму *Fusobacterium necrophorum* - К наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Динаміка титрів антитіл в РИГА у кролів, щеплених моновакциною із штаму *Fusobacterium necrophorum* - К

Термін дослідження	Група тварин		
	Контроль	Дослід	
		Титри	Ig
Вихідні дані	Антитіл не виявлено		
Після 1-го щеплення на 7-у добу на 14-у добу	Антитіл не виявлено	1 4-1 16 1 32-1 64	0,6-1,2 1,5-1,8
Після 2-го щеплення на 7-у добу на 14-у добу на 30-у добу		1 256-1 512 1 512-1 1024 1 256-1 512	2,4-2,7 2,7-3,0 2,4-2,7

Отже, встановлено, що моновакцина із штаму *Fusobacterium necrophorum* - К є імуногенною. Крім того, вакцина не викликає поствакцинальних ускладнень і викликає імунологічну відповідь та формування специфічних антитіл.

Антигенні властивості. Визначення антигенної спорідненості штаму *Fusobacterium necrophorum* - К з іншими епізоотичними штамами *Fusobacterium necrophorum* проводили по їх типізації з протинек-

робактеріозними сироватками в РИГА. Досліджено 5 різних епізоотичних штамів *F. necrophorum*, які були найбільш репрезентативними представниками роду *Fusobacterium* серед виділених по морфологічним, культуральним, біохімічним та вірулентним властивостям. Сироватки були виготовлені нами шляхом гіперімунізації кролів, вищезазначеними штамами.

Результати наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Показники антигенної спорідненості штамів *F. necrophorum*

Штам	Максимальні титри в РА з сироватками				
	<i>F. necrophorum</i> ДН-97	<i>F. necrophorum</i> - К	<i>F. necrophorum</i> ХС	<i>F. necrophorum</i> ЧН-2000	<i>F. necrophorum</i> ДОН
<i>F. necrophorum</i> ДН-97	1 2048	1 124	1 512	1 32	1 512
<i>F. necrophorum</i> - К	1 124	1 2048	1 32	1 512	1 512
<i>F. necrophorum</i> ХС	1 512	1 32	1 2048	1 32	1 512
<i>F. necrophorum</i> ЧН-2000	1 124	1 512	1 32	1 2048	1 32
<i>F. necrophorum</i> ДОН	1 512	1 512	1 512	1 32	1 2048

Як видно з таблиці 4, титри антитіл в протинекробактеріозних сироватках до гомологічних штамів *F. necrophorum* в РИГА становили 1 2048. Високо вираженою серологічною спорідненістю між собою володіли штами *F. necrophorum* - К, *F. necrophorum* ЧН-2000, *F. necrophorum* ДОН. Титри антитіл в перехресній РИГА між цими антигенами становили 1 512.

Результати досліджень свідчать про те, що запропонований штам *Fusobacterium necrophorum* - К володіє високою патогенністю, має антигенну спорідненість з іншими епізоотичними штамами *Fusobacterium necrophorum*, а також придатний для виробництва вакцини проти некробактеріозу,

Запропонований штам може бути використаний для виробництва вакцини проти некробактеріозу сільськогосподарських тварин.

Джерела інформації

1. Определитель бактерий Берджи /под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. Перевод с англ. акад. РАН Г. А. Заварзина - 9-е изд. в 2-х томах - 1997 - 800с.

2. А. А. Самоповов, С. В. Лопатин, В. А. Чурбанов, А. В. Киселев. Конструирование и оценка вакцин для профилактики некробактериоза крупного рогатого скота // Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с болезнями животных. Сб. науч.-тр. РАСХИ - Новосибирск, - 1997 -

С 108-113

3 Самоловов А А , Лопатин С В Некробактериоз крупного рогатого скота и пути решения проблемы //Аграрная Россия - 2001 -№3 -С 34-37

4 Федосеенко В А Усовершенствование

средств специфической профилактики некробактериоза крупного рогатого скота и копытной гнили овец Автореф дис канд вет наук 16 00 03 - Моск гос акад вет медицины и биотехнологии им К И Скрябина М- 1998 - 16 с