



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 58877

(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-XC

1

2

(21) 2002119093

(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, Бондар Тетяна  
Олександрівна(73) Риженко Василь Петрович, Дементьєва  
Світлана Авксентівна, Марченко Олександра Ми-  
колаївна, Галка Ігор Васильович, Бондар Тетяна  
Олександрівна

(57) Штам *Fusobacterium necrophorum*-XC, який  
депонований в колекції мікроорганізмів Державно-  
го науково-контрольного інституту біотехнології і  
штамів мікроорганізмів і має реєстраційний номер  
139 від 05 08 2002 року та використовується для  
виробництва інактивованої асоційованої вакцини  
проти некробактеріозу сільськогосподарських тва-  
рин, володіє стабільними морфологічними та  
культурально-біохімічними властивостями і є пато-  
генним для білих мишей

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

Аналогом винаходу є лабораторний штам *Fu-  
sobacterium necrophorum* BN - 2, що був викорис-  
таний для виготовлення анатоксин-вакцини проти  
некробактеріозу [2]. До недоліків даного штаму  
мікроорганізму можна віднести те, що він викорис-  
товується 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 хвороб  
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 [1].

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 наступні:

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

- для виробництва вакцини використовується  
бульйонна 2-х добова культура *Fusobacterium ne-  
crophorum* 2030A

- 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 І-

Метою даного винаходу є вакцинний штам *Fu-  
sobacterium necrophorum* - XC ("Херсонський"),  
який володіє стабільними морфологічними, куль-  
турально-біохімічними та патогенними властивос-  
тями і виділений з матеріалу відібраного від вели-  
кої рогатої худоби з ознаками некробактеріозу в  
одному із господарств Херсонської області

Штам *Fusobacterium necrophorum* ~ XC, отри-  
маний шляхом культивування ізоляту з вражених  
ділянок дистальних відділів кінцівок великої рога-  
тої худоби, співробітниками лабораторії анаероб-  
них інфекцій ГОМУААН

Штам *Fusobacterium necrophorum* - XC депоно-  
ваний в колекції мікроорганізмів Державного нау-  
ково-контрольного інституту біотехнології і штамів  
мікроорганізмів і має реєстраційний номер 139 від  
05 08 2002р.

Морфологічні властивості. У мазках із буль-  
йонних та агарових культур, штам *Fusobacterium  
necrophorum* - XC має вигляд довгих ниток, що  
формують зплетіння, рідше короткими ланцюжка-  
ми. Бактерія за Грамом фарбується негативно,  
спор та капсул не утворює. При фарбуванні за  
Муромцевим, має вигляд тонких довгих ниток з  
чітко вираженою мілкою зернистістю

(13) A

(11) 58877

(19) UA

Культуральні властивості При культивуванні на середовищі Кітта-Тароцці (рН=7,4±0,2), штам *Fusobacterium necrophorum* - ХС через 24±6 години викликає значне помутніння середовища, при подальшому культивуванні утворюється кришко-видний осад на дні пробірки, при цьому ріст супроводжується утворенням газу, що має неприємний гнилісний запах. Оптимальна температура культивування 36-37°C.

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

Ферментативні властивості Штам *Fusobacterium necrophorum* - ХС ферментує з утворенням кислоти і газу глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, не ферментує фруктозу, маніт, дульцит, утворює індол та сірководень.

Таблиця 1

Біохімічні властивості штаму  
*Fusobacterium necrophorum* – ХС

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

Патогенні властивості Штам *Fusobacterium ne-*

*crophorum* - ХС патогенний для великої рогатої худоби, кролів та білих мишей. У кролів на 4-5 день при підшкірному введенні семидобової бульйонної культури в дозі 1см<sup>3</sup> викликає некроз на місці введення та загибель тварин на 8-12 добу, 100%-ну загибель білих мишей викликає в дозі 0,5см<sup>3</sup> та кількістю мікробних клітин 4,8х10<sup>10</sup> м.к./см<sup>3</sup>. Стабільність вірулентності встановлена шляхом 8-х кратних пасажів та лабораторних спостережень на протязі ряду років.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1 Штам *Fusobacterium necrophorum* - ХС (культура 1), отриманий шляхом культивування ізоп'яту 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 0,5см<sup>3</sup> по 10 тварин на кожне введення, гинуло 90-100% тварин, при 100% збереженні у контролі.

Приклад 2 Штам *Fusobacterium necrophorum* - ХС (культура 2), отриманий шляхом культивування ізоп'яту з уражених ділянок 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 0,5см<sup>3</sup> по 10 тварин на кожне введення, гинуло 10-20% тварин при 100% збереженні у контролі.

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

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> -ХС (культура 1)	+	-	2 доби	+	+	10/10
F <i>necrophorum</i> -ХС (культура 2)	-	+	2 доби	-	+	2/10

Примітка Н - нитчаста форма, П - поліморфна форма.

Імуногенні властивості, із штаму *Fusobacterium necrophorum* АС була виготовлена моновакцина для встановлення імуногенності штаму у дослідах на білих мишах та кролях. Лабораторних тварин щепили підшкірно двічі з інтервалом 14 діб у дозах білих мишей по 0,5см<sup>3</sup>, кролів по 1,0см<sup>3</sup> з концентрацією мікробних клітин 4млрд м.к./см<sup>3</sup>. На 10-ту добу після другого щеплення провели госпре

зараження дослідних та контрольних (не щеплених) тварин бульйонною культурою штаму *Fusobacterium necrophorum* ХС в дозі 0,5см<sup>3</sup> та концентрацією мікробних клітин 4,8х10<sup>8</sup>. 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* КС наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Динаміка титрів антитіл в РНГА у кролів, щеплених моновакциною із штаму *Fusobacterium necrophorum* ХС

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

Отже, встановлено, що моновакцина із штаму *Fusobacterium necrophorum* - ХС 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* - ХС з іншими епізоотичними штамами *Fusobacterium necrophorum* проводили по їх типізації з про-

тинекробактеріозними сироватками в РНГА. 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 наведеш 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> КС	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 РНГА становили 1 2048. Високо вираженою серологічною спорідненістю між собою володіли штами *F. necrophorum* - ХС та *F. necrophorum* ДН-97 і *F. necrophorum* ДОН. Титри антитіл в перехресній РНГА між цими антигенами становили 1 512.

Результати досліджень свідчать про те, що запропонований штам *Fusobacterium necrophorum* - ХС 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. Хоупта, 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. Самоловов, С. В. Лопатил, 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. - 16с.

