



УКРАЇНА

(19) UA (11) 58878 (13) A  
(51) 7 A61K39/114МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ВАКЦИННИЙ ШТАМ FUSOBACTERIUM NECROPHORUM ЧН-2000

1

(21) 2002119094

(22) 15 11 2002

(24) 15 08 2003

(46) 15 08 2003, Бюл. № 8, 2003 р.

(72) Риженко Василь Петрович, Дементьєва  
Світлана Авксентівна, Ображей Анатолій Федорович,  
Бондар Тетяна Олександрівна, Кучерявенко  
Олексій Олександрович(73) Риженко Василь Петрович, Дементьєва  
Світлана Авксентівна, Ображей Анатолій Федорович,  
Бондар Тетяна Олександрівна, Кучерявенко  
Олексій Олександрович

2

(57) Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000, який депонований в колекції мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів і має реєстраційний номер 140 від 05 08 2002 року, використовується для виробництва інактивованої асоційованої вакцини проти некробактеріозу сільськогосподарських тварин, володіє стабільними морфологічними та культурально-біохімічними властивостями і є патогенним для білих мишей (100%-ну загибель білих мишей викликає в дозі  $0,5 \text{ см}^3$  кількістю мікробних клітин  $5,8 \times 10^8$ )

Винахід відноситься до ветеринарної мікробіології, зокрема до нового штамів анаеробного мікроорганізму, що використовується для виготовлення вакцини проти некробактеріозу сільськогосподарських тварин.

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

Прототипом винаходу є колекційний штам *Fusobacterium 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 патогенний для білих мишей і при культивуванні на кров'яному агарі викликає гемолиз еритроцитів, а також володіє подібними морфологічними та культурально-біохімічними властивостями.

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

Відмінними ознаками прототипу від заявлено-го штаму є наступні:

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

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

- вакцина "Нековак", компонентом якої є антиген 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 *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 ("Чернігівський - 2000"), який володіє стабільними морфологічними, культурально-біохімічними та патогенними властивостями і виділений з матеріалу відібраного від великої рогатої худоби з ознаками некробактеріозу в одному із господарств Чернігівської області.

Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000, отриманий шляхом культивування ізоляту з вражених ділянок дистальних відділів кінцівок великої рогатої худоби, співробітниками лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ УААН.

Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 депонований в колекції мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів і має реєстраційний номер 140 від 05 08 2002 р.

Морфологічні властивості. У мазках із бульйонних та агарових культур, штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 має вигляд поліморфних форм клітин (короткі палички, поодинокі палич-

(13) A  
(11) 58878  
(19) UA

ки, палички з шаровидними вздуттями), що при фарбуванні звичайними аніліновими фарбами - фуксином Ціля, синькою Лефлера, а також по Муромцеву, мають добре виражену зернистість

Культуральні властивості. Оптимальна температура культивування штаму  $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$ . На середовищі Кітта-Тароцці поява росту відмічається через 24-36 годин, що супроводжується помутнінням середовища, при подальшому культивуванні утворюється кришковидний осад на шматочках печінки. На агаровому середовищі з 5-10%-ми крові чи сироватки крові великої рогатої худоби та 5-10%-ми глюкози, в анаеробних умовах утворює дрібні до 1 мм сірувато-білі колонії. Не утворює гемолізу на кров'яному агарі.

Ферментативні властивості. Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 ферментує з утворенням кислоти і газу глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, не ферментує фруктозу, маніт, дупьцит. Утворює індол та сірководень.

Таблиця 1

Біохімічні властивості штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000

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

Патогенні властивості. Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 патогенний для великої рогатої худоби, кролів та білих мишей. У кролів на 4-5 день викликає некроз при підшкірному введенні семидобової бульйонної культури в дозі  $1 \text{ см}^3$  та загибель тварин на 7-9 добу, 100%-ну загибель білих мишей викликає в дозі  $0,5 \text{ см}^3$  та кількістю мікробних клітин  $5,8 \times 10^9$ . Стабільність вірулентності штаму встановлена шляхом 6-ти кратних пасажів протягом 2 років.

Винахід ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 (культура 1) отриманий шляхом культивування ізоляту з уражених ділянок дистальних відділів кінцівок великої рогатої худоби, від селекційований, як такий, що володіє характерними для роду *Fusobacterium*, родини *Bacteroidaceae* морфологічними та культурально-біохімічними властивостями. Але був патогенним для білих мишей, оскільки при підшкірному та внутрішньочеревному введенні двохдобової бульйонної культури в дозі  $0,5 \text{ см}^3$  по 10 тварин на кожне введення, гинуло 90-100 % тварин, при 100 % загибелі у контролі.

Приклад 2. Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 (культура 2), отриманий шляхом культивування ізоляту з уражених ділянок печінки кінцівок великої рогатої худоби, що володіє характерними для роду *Fusobacterium*, родини *Bacteroidaceae* морфологічними та культурально-біохімічними властивостями, але був слабкопатогенним для білих мишей, оскільки при підшкірному та внутрішньочеревному введенні бульйонної культури в дозі  $0,5 \text{ см}^3$  по 10 тварин на кожне введення, гинуло 10-20 % тварин, при 100% загибелі 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> ЧН-2000 (культура 1)	+	±	7 діб	+	+	10/10
F <i>necrophorum</i> ЧН-2000 (культура 2)	-	+	7 діб	-	+	2/10
F <i>necrophorum</i> ЧН-2000 (культура 3)	-	+	7 діб	-	+	4/10

Примітка: Н - нитчата форма, П - поліморфна форма

Приклад 3. Штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000, отриманий шляхом культивування ізоляту 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  $0,5 \text{ см}^3$  по 10 тварин на

кожне введення, гинуло 30-40 % тварин, при 100 % загибелі у контролі.

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

Імуногенні властивості. Із штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 була виготовлена моновакцина для встановлення імуногенності штаму у дослідах на білих мишах та кролях. Лабораторних тварин щепили підпікряно двічі з інтервалом 14

дiб у дозах бiлих мишей по 0,5 см<sup>3</sup>, кролiв по 1,0 см<sup>3</sup> з концентрацiєю мiкробних клiтин 4 млрд м/см<sup>3</sup>. На 10-ту добу пiсля другого щеплення провели гостре зараження дослiдних та контрольних (не щепленi) тварин бульйонною культурою штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-

2000 в дозi 0,5 см<sup>3</sup> та концентрацiєю мiкробних клiтин 5,8х10<sup>8</sup>. Тварини iз дослiдноi групи залишилися живими у порiвняннi з 100%-вою загибеллю в контролi. Титри антитiл у сироватцi кровi кролiв, щеплених моновакциною iз штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 наведенi у таблицi 3.

Таблиця 3

Динамiка титрiв антитiл в РНГА у кролiв, щеплених моновакциною iз штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000

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 вияв- лено	1 4-1 16	0,6-1,2
		1 32-1 64	1,5-1,8
Після 2-го щеплення на 7-у добу на 14-у добу на 30-у добу			
1 256-1 512		2,4-2,7	
1 512-1 1024		2,7-3,0	
1 256-1 512	2,4-2,7		

Отже, встановлено, що моновакцина iз штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 є iмуногенною. Крім того, вакцина не викликає поствакцинальних ускладнень i викликає iмунологiчну вiдповiдь та формування специфiчних антитiл.

Антигеннi властивостi. Визначення антигенної спорiдненостi штаму *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 з iншими eпiзоотичними штамами *Fusobacterium necrophorum* проводили по iх типизацi з

протинекробактерiозними сироватками в РНГА. Дослiджено 5 рiзних eпiзоотичних штамiв *F. necrophorum*, якi були найбільш репрезентативними представниками роду *Fusobacterium* серед видiлених по морфологiчним, культуральним, бiохiмiчним та вiрулентним властивостям. Сироватки були виготовленi нами шляхом iпериmuнiзацi кролiв, вище зазначеними штамами.

Результати наведенi у таблицi 4.

Таблиця 4

Показники антигенної спорiдненостi штамiв *F. necrophorum*

Штам	Максимальнi 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 таблицi 4, титри антитiл в протинекробактерiозних сироватках до гомологiчних штамiв *F. necrophorum* в РНГА становили 1 2048. Високо вираженою серологiчною спорiдненiстю мiж собою володiли штами *F. necrophorum* ЧН-2000 та *F. necrophorum* - К. Титри антитiл в перехреснiй РНГА мiж цими антигенами становили 1 512.

Результати дослiджень свiдчать про те, що запропонований штам *Fusobacterium necrophorum* ЧН-2000 володiє високою патогеннiстю, має антигенну спорiдненiсть з iншими eпiзоотичними штамами *Fusobacterium necrophorum*, а також придатний для виробництва вакцини проти некробактерiозу.

Запропонований штам може бути використаний для виробництва вакцини проти некробактерiозу сiльськогосподарських тварин.

Джерела iнформацiї

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

2. А. А. Самоловов, С. В. Допатин, 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. РАСХН. — 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 некробак-

териоза 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 Скрыбина М,- 1998 - 16с