



(19) KG (11) 466 (13) C1

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)⁷ C12N 1/20; A61K 39/00
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(21) 20000026.1

(22) 07.04.2000

(46) 01.08.2001, Бюл. №7

(71)(73) Чолжиев А.К., Раимбеков Д.Р. (KG)

(72) Раимбеков Д.Р., Чолжиев А.К. (KG)

(56) Семенова И.Н. Типизация и биологические свойства штаммов возбудителя копытной гнили овец, выделенных в различных зонах страны: Автореф. дис... канд. вет. наук. - М., 1982. - 17 с.

(54) Штамм бактерий Dichelobacter nodosus 1.1/99 - АВ

(57) Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, в частности, к получению биологических препаратов, и может быть использовано для приготовления антигена с целью серологической диагностики, а также для приготовления вакцины против копытной гнили овец и коз. Целью изобретения является получение нового штамма, обладающего отличительными свойствами от аналогов. Эти свойства позволяют улучшению качества антигена и вакцины, что в свою очередь дает возможность поставить точный диагноз на копытную гниль с учетом серотипов и улучшить профилактику при копытной гнили мелкого рогатого скота. Штамм бактерий Dichelobacter nodosus 1.1/99-АВ был выделен и типизирован в апреле 1999 года от больных копытной гнилью овец Чуйской области Кыргызской Республики. Для изучения морфо-тинкториальных и биохимических свойств Dichelobacter nodosus были испытаны множества питательных сред, а также выделены и изучены многие изоляты, отличающиеся от аналогов. 2 табл., 2 пр.

Изобретение относится к ветеринарной микробиологии, и может быть использовано для приготовления антигена и вакцины против копытной гнили мелкого рогатого скота.

Известен штамм Bacteroides nodosus K-8. (Семенова И.Н. Типизация и биологические свойства штаммов возбудителя копытной гнили овец, выделенных в различных зонах страны: Автореф. дис... канд. вет. наук. - М., 1982. - 17 с.), из которого был изготовлен антиген.

Недостатком штамма K-8 является то, что в нем не были установлены серотипы B. nodosus, из-за чего не всегда удается установить точный диагноз на копытную гниль. Известна также приготовленная из B. nodosus вакцина против копытной гнили овец (а.с.

SU №1125814, 1984). Недостатком данной вакцины является трудоемкость ее получения, параректальное двукратное введение, непродолжительный иммунитет (120 дней) и слабая иммуногенность - до 60 %. В настоящее время данная вакцина биопромышленностью Российской Федерации не выпускается.

Задача изобретения - изыскание такого штамма, который лишен указанных недостатков, и вакцина, приготовленная из него, была бы высокоиммуногенной, проста при инъекции животным, а также защищала их от копытной гнили на длительный срок, а антиген, приготовленный из него, давал бы возможность ставить точный диагноз.

От больных копытной гнилью овец выделен и типизирован штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB, который, отличается от прототипа более высокой вирулентностью, ранним образованием сероводорода и главное, наличием в одном штамме одновременно антигенов к серотипам А и В. В отечественной и зарубежной литературе бактерия с такими свойствами не описана. Роль антигенной структуры бактерий *D. nodosus* очень значительна при приготовлении вакцины против копытной гнили овец. Исследованиями многих ученых (Thorley, Egerton, Stewart, Lee и др.) подтверждены эффективность поливалентных вакцин при копытной гнили овец. Их эффективность была тем выше, чем больше для изготовления вакцины было вовлечено серотипов бактерий *D. nodosus*.

Штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB обладает стабильными свойствами (высокая вирулентность, наличие в одной микробной клетке антигена, относящегося к А и В серотипам), пригоден для приготовления вакцины и диагностического препарата при копытной гнили мелкого рогатого скота.

Штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB выделен от овцы, пораженной копытной гнилью. Выращен в анаэробных условиях на 4-е сутки инкубации в термостате при температуре 37°C.

Штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB имеет следующие морфологические, культуральные, биохимические характеристики.

Морфологические признаки *D. nodosus* являются грамотрицательной, строго анаэробной бактерией из семейства *Cardiobacteriaceae* рода *Dichelobacter* (Dewhirst et al., 1990). Спор и капсул не образует, полиморфна и весьма требовательна к составу питательных сред.

Клетки бактерии *D. nodosus* - прямые или слегка изогнутые палочки размером 0.6 - 1.0 x 6.0 - 8.0 мкм, они биполярны и на концах встречается вздутие. По Граму окрашиваются отрицательно. В некоторых случаях бактериальные палочки окружены отходящими радиально грамотрицательными мелкими палочками (феномен Беверидже).

Электронно-микроскопическое исследование бактерий *D. nodosus* проводилось в лаборатории института патологии Берлинского свободного университета. Было установлено, что поверхность штамма бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB была покрыта пиявами (филаментозным придатком). Длина пияв доходит до 2500 нм, а диаметр 6 нм.

Культуральные признаки. Для выращивания колоний бактерий использованы плотные питательные среды: *Columbia basis medium*, *Restellan medium*, *TAS medium* и ТЦГА с дефибринированной кровью лошади. Интенсивный рост наблюдался на 3-4 сутки культивирования при температуре 37°C. Оптимальной средой является *Columbia basis medium*, так как на ней колонии бактерий растут хорошо.

Бактерии, выросшие на среде *Columbia*, имели шероховатую поверхность расстилающейся зоной с выпуклым центром, специфическим запахом спермы, что характерно только для этих бактерий. А также при преломляющем свете колонии имеют серебристый цвет. После смыва колоний с питательной среды на их местах отмечаются углубления.

Рост бактерий на питательной среде *Ristellan* так же характерен, колонии бактерий имеют шероховатую поверхность с выпуклым центром, напоминая вид жемчужин, но не

имеют расстилающейся зоны, ярко выраженного запаха и углублений на питательных средах.

На среде ТЦГА бактерии образовывали плоские, округлые колонии с бугристой поверхностью, диаметром 1 - 3 мм с волокнистым краем. Колонии имели сухую консистенцию, часто были прозрачными.

На питательной среде TAS колонии имеют гладкую поверхность, с выпуклым центром, лишь по краям колоний отмечается узкая кайма шероховатости. Колонии сравнительно мельче, чем на вышеупомянутых питательных средах, иногда встречаются углубления на месте колоний.

Главным отличительным свойством бактерий *D. nodosus* - это подвижность колоний, которая наблюдается при их росте. Они растут не на штрихе, а сбоку. Есть еще некоторые данные о росте исследуемой бактерии, частота штриха особо влияет на рост бактерий. Чем гуще штрих, тем мельче колонии и очень неясная зона расстилания, то есть колонии при частом высеве игнорируют рост друг друга, что также мешает селективной работе. При редком высеве хорошо видны колонии бактерий, они растут каждая по отдельности, имея шероховатую поверхность и образуя зону расстилания, образовывая так называемый вид "жемчужин".

В отличие от немецкого штамма 474-DE, выделенного Чолжиевым А., и от штамма K-8 изобретенный штамм на 24 ч раньше образовывал сероводород, был более вирулентен, т.к. начал расщеплять эластин на 48 ч раньше аналогов, в одной микробной клетке имел антиген, относящийся к A и B серотипам бактерий.

Биохимические свойства. Четырехдневные культуры штамма бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB при исследованиях показали следующие важные биохимические свойства (табл. 1).

Положительные реакции - образование аммиака из аргенина и фосфотазы; образование сероводорода; протеолитические свойства на желатине, казеине и альбумине; расщепление эластина.

Отрицательные реакции - образование газа или кислоты из углеводов; гидролиз крахмала и эскулина; образование индола и нитрата; гемолиз каталазы, липазы, лецитиназы и тиалоронидазы. Рост на 0.1 %-ной желчи.

Таблица 1

№	Тест	Результаты (+)(-)	
		D.n.1/99-AB	D.n.474-DE
1	образование аммиака из: аргенина	+	+
	фосфотазы	+	+
2	образование сероводорода	+ на 2 сутки	+ на 3 сутки
3	протеолитические свойства на: желатине	+	+
	казеине	+	+
	альбумине	+	+
4	расщепление эластина	+ на 3 сутки	+ на 5 - 8 сутки
5	образование газа или кислоты из углеводов	-	-
	гидролиз: эскулина	-	-
	крахмала	-	-
	гемолиз: каталазы	-	-
	липазы	-	-
	лекитиназы	-	-
	тиалоронидазы	-	-
	образование: индола	-	-

	нитрата	-	-
	гемолиз	-	-
	вид колоний:		
	мукoidный	-,+ —	+
	круглая	—	+
	буторчатые	+	—
	прочие	—	—

Таблица 2
Чувствительность к антибиотикам

№	Антибиотик	Кол-во вещества в мкг	Спектр действия в мм
1	2	3	4
1	Benzylpenicillin	30	40 и более
2	Chloramphenicol	30	40 и более
3	Streptomycin	30	40 и более
4	Oxytetrazyklin	30	40 и более
5	Neomycin	30	40 и более
6	Erythromycin	10	40 и более
7	Nitrofurantoin	300	40 и более
8	Sulfamerazin	200	40 и более
9	Metronidazol	100	40 и более
10	Ampicillin	20	40 и более
11	Gentamycin	10	29.6
12	Polymyxin B	12.5	28.4
13	Oleandomycin	15	35.6
14	Colistine	10	31.8
15	Colistine	60	40
16	Kanamycin	75	33.0
17	Kanamycin	100	34.0
18	Metronidazol	10	25.4
19	Nalidixinsaere (кислота)	30	19.8
20	Vankomycin	5	Resistant
21	Vankomycin	7.5	Resistant
22	Lincomycin	10	40 и более

Штамм можно использовать для приготовления инактивированной вакцины против копытной гнили мелкого рогатого скота. Поэтому важным свойством производного штамма является стабильность вирулентных свойств.

Стабильность вирулентных свойств определяется заражением восприимчивых животных. Восприимчивыми являются парнокопытные, в частности, овцы и козы.

Лабораторные животные не восприимчивы.

Пример 1. Штаммом в дозе 1 млрд. микробных клеток были заражены 8 здоровых овец кыргызской тонкорунной породы. Все овцы заболели и имели типичные для копытной гнили клинические признаки. Инкубационный период болезни составил в 5 - 7 дней. Штамм показал высокую вирулентность.

Для сравнения эпизоотическими культурами была поставлена биопроба на 41 здоровой овце кыргызской тонкорунной породы и на 6 козах кыргызской пуховой породы. Патологический материал был взят от спонтанно больных копытной гнилью овец.

Все подопытные животные заболели и имели типичные для копытной гнили клинические признаки. Инкубационный период болезни составил также 5-7 дней.

Пример 2. Штаммом, а также эпизоотическими культурами была поставлена биопроба на 24 кроликах (по 12 голов в каждой группе).

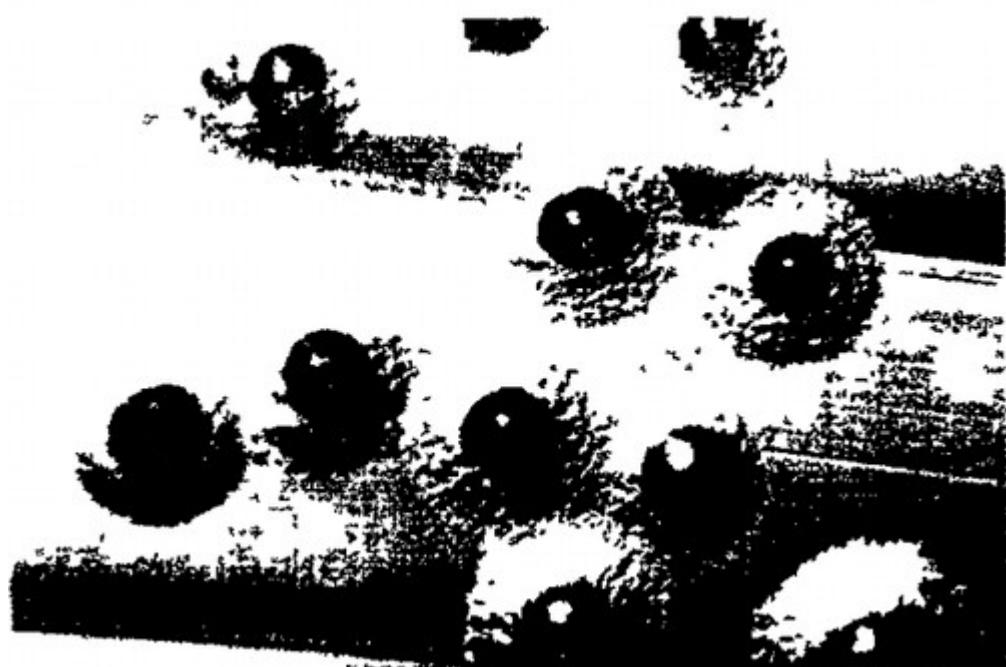
Кроликам первой группы вводили подкожно в область средней трети наружной поверхности уха 1 млрд. микробных клеток штамма. Второй группе таким же методом вводили суспензию с эпизоотическими культурами в количестве 1 мл. Наблюдения за зараженными животными вели в течение 10 суток. Животные обеих групп не заболели.

При типизации культур штамма бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB пассажированых многократно через восприимчивых животных не обнаружено изменений их антигенных свойств.

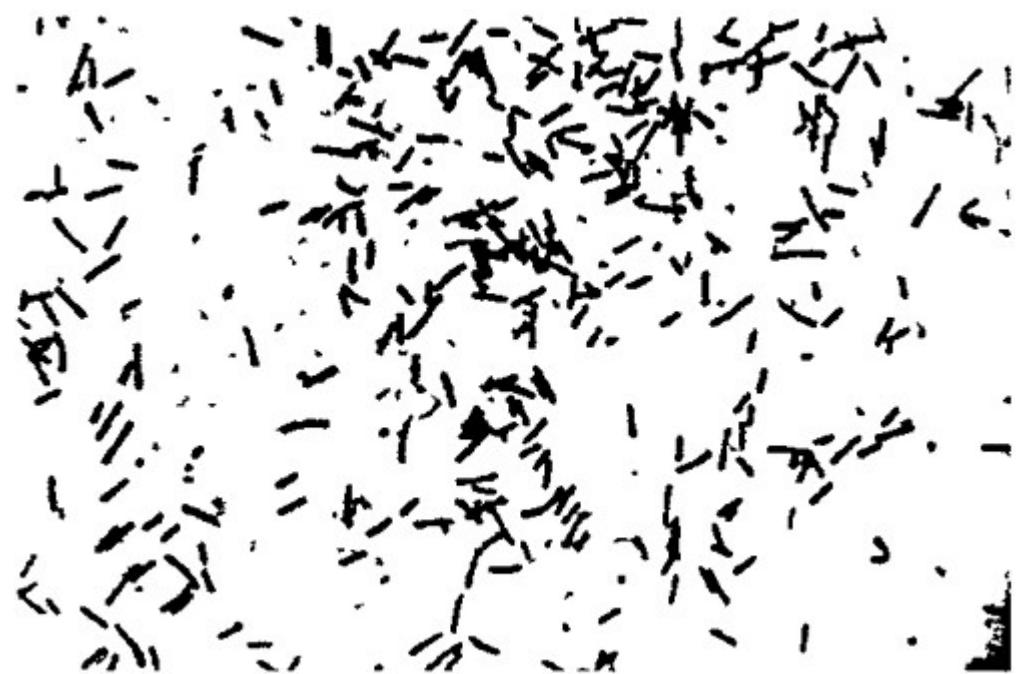
Таким образом, штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB обладает стабильностью и по вирулентности идентичен циркулирующим в естественных условиях эпизоотическим культурам: *Dichelobacter nodosus*.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Dichelobacter nodosus* 1.1/99-AB для получения антигена с целью серологической диагностики копытной гнили меткого рогатого скота.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Никифорова М.Д.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03