



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2007148219/15, 24.10.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.10.2002

Приоритет(ы):

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2004116134 24.10.2002

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2009 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 10.10.2011 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2051970 C1, 10.01.1996. РОЙТ А.,
Основы иммунологии. - М.: Мир, 1991, с.91.
Справочник по микробиологическим и
вирусологическим методам исследования под
ред. М.О. БИРГЕРА. - М.: Медицина, 1973,
с.128-129.

Адрес для переписки:

101000, Москва, М. Златоустинский пер., 10,
кв. 15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов. И.А.
Веселицкой, рег. № 11

(72) Автор(ы):

ВАСКЕС Мария-Элена (МХ),
КАМПОГАРРИДО Рауль (МХ),
ГОНСАЛЕС-ЭРНАНДЕС Карлос (МХ),
СИВАНАНДАН Ваитианатан (US)

(73) Патентообладатель(и):

БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА
С.А. ДЕ С.В. (МХ)

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ PASTEURELLA TREHALOSI И/ИЛИ MANNHEIMIA HAEMOLYTICA У ДОМАШНЕЙ ПТИЦЫ (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области ветеринарии. Способ включает стадии: получения образца из организма домашней птицы, где образец выбирают из группы, включающей кровь, сыворотку, плазму, тканевые соскобы, смывы, мазки, ткань, или отделение протеинов бактерий, выбранных из группы Pasteurella trehalosi и/или Mannheimia haemolytica, которые депонированы под регистрационными номерами ATCC № PTA-3667, ATCC № PTA-3668, ATCC № PTA-3669, с помощью гель-электрофореза на

полиакриламидном геле и перенос их на пригодный носитель; инкубирование указанного образца или носителя с антителами, специфичными в отношении бактерий, выбранных из группы Pasteurella trehalosi и/или Mannheimia haemolytica, которые депонированы под регистрационными номерами ATCC № PTA-3667, ATCC № PTA-3668, ATCC № PTA-3669, и определение наличия комплекса антиген-антитело. Группа изобретений обладает высокой диагностической точностью. 2 н. и 1 з.п. ф-лы, 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2007148219/15, 24.10.2002**

(24) Effective date for property rights:
24.10.2002

Priority:
2004116134 24.10.2002

(43) Application published: **10.07.2009** Bull. 19

(45) Date of publication: **10.10.2011** Bull. 28

Mail address:
**101000, Moskva, M. Zlatoustinskij per., 10, kv.
15, "EVROMARKPAT", pat.pov. I.A. Veselitskoj,
reg. № 11**

(72) Inventor(s):
**VASKES Marija-Ehlana (MX),
KAMPOGARRIDO Raul' (MX),
GONSALES-EhrNANDES Karlos (MX),
SIVANANDAN Vaitianatan (US)**

(73) Proprietor(s):
**BERINGER INGEL'KhAJM VETMEDIKA S.A.
DE S.V. (MX)**

(54) METHOD TO DETECT BACTERIA PASTEURELLA TREHALOSI AND/OR MANNHEIMIA HAEMOLYTICA IN POULTRY (VERSIONS)

(57) Abstract:

FIELD: veterinary science.

SUBSTANCE: method includes the following stages: getting a sample from a poultry's organism, where the sample is selected from the group, including blood, serum, plasma, tissue scrapes, swabs, smears, tissue or separation of bacteria proteins selected from the group Pasteurella trehalosi and/or Mannheimia haemolytica, which are deposited under the registration numbers ATSS No. RTA-3667, ATSS No. RTA-3668, ATSS No. RTA-3669, with the help of gel electrophoresis on

polyacrylamide gel and their transfer to a suitable carrier; incubation of the specified sample or the carrier with antibodies specific in respect of bacteria selected from the group Pasteurella trehalosi and/or Mannheimia haemolytica, which are deposited under the registration numbers ATSS No. RTA-3667, ATSS No. RTA-3668, ATSS No. RTA-3669, and detection of availability of antigen-antibody complex.

EFFECT: group of inventions has high diagnostic accuracy.

3 cl, 2 tbl, 6 ex

RU 2 430 967 C2

RU 2 430 967 C2

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области ветеринарии и, в частности, к возбудителям нового бактериального заболевания домашней птицы, т.е. *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Настоящее изобретение относится также к указанным бактериям *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, к вакцине, содержащей инактивированные *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, и к способу иммунизации цыплят с целью предупреждения у них заболевания.

Предпосылки создания изобретения

В последнее десятилетие интенсивные методы разведения домашней птицы с целью повышения продуктивности привели к увеличению случаев заболевания домашней птицы в большинстве стран-производителей. Это обуславливает необходимость разработки новых и более эффективных вакцин и программ вакцинации для контроля этих заболеваний. В настоящее время большинство животных иммунизируют против целого ряда заболеваний вирусного и бактериального происхождения.

Примерами вирусных заболеваний домашней птицы являются ньюкаслская болезнь, инфекционный бронхит, птичья пневмония, оспа птиц, инфекционный бурсит птиц и т.д.

Примерами бактериальных заболеваний являются катар верхних дыхательных путей птиц, вызываемый *Haemophilus paragallinarum* (верхняя область дыхательного пути), *Bordetella avium* (верхняя область дыхательного пути), *Ornithobacterium rhinotracheale* (нижняя область дыхательного пути), инфекции, вызываемые *Salmonella* (пищеварительный тракт), *Pasteurella multocida*, возбудителем холеры птиц (септической), и болезни, вызываемые *E. coli*.

Таким образом, в основу настоящего изобретения была положена задача идентифицировать новое бактериальное заболевание домашней птицы, выявить возбудитель заболевания и разработать вакцину для того, чтобы предупреждать заболевание.

Подробное описание изобретения

Определение понятий, применяемых в описании

Перед описанием вариантов осуществления настоящего изобретения следует отметить, что в контексте настоящего описания и в приведенной ниже формуле изобретения, если специально не указано иное, то понятие, приведенное в единственном числе, также включает множественное число. Так, например, понятие *Pasteurella trehalosi* включает все множество бактерий *Pasteurella trehalosi*, понятие «клетка» включает одну или множество клеток и их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т.д. Вне зависимости от того, начинается ли слово с прописной буквы или нет, например «Арабиноза» и «арабиноза», оно имеет одинаковое значение, если специально не указано иное. Если не указано иное, все технические и научные понятия имеют общепринятые значения, известные специалистам в области, к которой относится изобретение. Хотя для практического воплощения или тестирования настоящего изобретения можно применять любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные приведенным в настоящем описании, ниже представлены предпочтительные методы, устройства и материалы. Все упомянутые в настоящем описании публикации включены в него в качестве ссылок для характеристики и описания клеточных линий, векторов и методологий, которые описаны в публикациях и которые можно применять в контексте изобретения. Ничего из вышеизложенного не должно быть истолковано в том смысле, что изобретение не имеет права претендовать на более ранний приоритет.

При создании изобретения неожиданно было открыто новое бактериальное заболевание домашней птицы, которое затрагивает, прежде всего, несушек и реж бройлеров. Заболевание обнаружено у цыплят, которые были вакцинированы против бактерий *Haemophilus paragallinarum* (возбудитель катар верхних дыхательных путей птиц) и *Pasteurella multocila* (возбудитель холеры птиц). Симптомы этого нового заболевания отличаются от специфических симптомов катар верхних дыхательных путей. С учетом того факта, что для вновь открытого заболевания, как это будет описано ниже, характерны клинические симптомы инфекции верхних дыхательных путей, то его возбудителем не может быть *H. paragallinarum*.

Первым объектом настоящего изобретения являются грамотрицательные, факультативно анаэробные, плеоморфные имеющие форму палочек бактерии, которые являются возбудителями нового заболевания верхних дыхательных путей и половых путей домашней птицы, где бактерии выбирают из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*.

Бактерии, описанные в изобретении, можно выделять из зараженных трахей, небной щели, яичника, печени, сердца, почки и гонад (бройлеры). Согласно изобретению их можно идентифицировать как *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* на основе указанных ниже тестов:

Бета-гемолиз	+
Окраска штамма по Граму	-
Оксидаза	+
Каталаза	+
Уреаза	-
Нитраты	+
Индол	-

Бактериальные изоляты можно очищать и осуществлять их биотипирование согласно методу, описанному у Jaworski и др. (1). Этот метод также описан в примерах. Важным методом классификации бактерий является гибридизация ДНК-ДНК, REA (анализ с помощью рестриктаз, см., например, в *J. Clinical Microbiol*, 31, 1993, сс.831-835) и риботипирование. Специалист в данной области может применять эти методы для того, чтобы установить, подпадают ли бактерии под объем настоящего изобретения. Метод контрольного заражения для подтверждения постулата Коха также приведен в примерах.

Таким образом, важным вариантом осуществления настоящего изобретения являются бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, где эти виды *Pasteurella* и/или *Mannheimia* являются позитивными в отношении бета(β)-гемолиза, грамотрицательными, позитивными в отношении оксидазы, позитивными в отношении каталазы, негативными в отношении уреазы, позитивными в отношении нитратов и негативными в отношении индола. Предпочтительно бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в настоящем изобретении, являются также MacConkey-позитивными. Еще более предпочтительные согласно изобретению бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* дополнительно являются позитивными в отношении глюкозы, позитивными в отношении сахарозы, позитивными в отношении маннита, негативными в отношении арабинозы, негативными в отношении целобиозы, позитивными в отношении ксилозы, негативными в отношении салицина, негативными в отношении орнитина, негативными в отношении эскулина, негативными в отношении альфа-фукозидазы, позитивными в отношении бета-галактозидазы. Наиболее предпочтительными

согласно изобретению являются бактерии *Pasteurella trehalosi*, когда *Pasteurella* являются также негативными в отношении арабинозы и позитивными в отношении трегалозы. Предпочтительно также согласно изобретению, чтобы *Pasteurella trehalosi* являлись также в зависимости от биотипа негативными или позитивными в отношении бета(β)-глюкозидазы. Также наиболее предпочтительными согласно изобретению являются бактерии *Mannheimia haemolytica*, где *Mannheimia*, кроме того, являются негативными в отношении арабинозы и негативными в отношении трегалозы. Предпочтительно также согласно изобретению, чтобы *Mannheimia haemolytica* являлись также негативными в отношении бета-глюкозидазы.

Эти характерные свойства описанных в изобретении бактерий позволяют рассматривать эти бактерии как новые по сравнению с известными бактериальными патогенами домашней птицы (*Diseases of Poultry*, 10-е изд., под ред. В.В. Calnek, изд-во Iowa State University Press, Iowa, USA, 1997).

Другим предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются описанные в изобретении бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, где домашнюю птицу выбирают из группы, включающей цыплят, индеек, уток, гусей, лесных голубей, домашних голубей и перепелов.

Изобретение относится также к новому типу грамотрицательных, факультативно анаэробных, плеоморфных имеющих форму палочек бактерий, для этого нового типа бактерий характерны бактерии, депонированные в американской коллекции типовых культур (ATCC), 1081, University Boulevard, Манассас, шт.Виргиния, 20110 - 2209, USA, под следующими регистрационными номерами:

Pasteurella trehalosi ATCC No. РТА-3667 (обозначение для внутреннего использования BIV-4985);

Pasteurella trehalosi ATCC No. РТА-3668 (обозначение для внутреннего использования BIV-AVICOR);

Mannheimia haemolytica ATCC No. РТА-3669 (обозначение для внутреннего использования BIV-07990).

Дата депонирования 22 августа 2001 г.

Таким образом, наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются бактерии *Pasteurella trehalosi*, депонированные под регистрационным номером ATCC No. РТА-3667. Эти бактерии дополнительно описаны в таблице 3 примера 1.

Другим наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются бактерии *Pasteurella trehalosi*, депонированные под регистрационным номером ATCC No. РТА-3668. Эти бактерии дополнительно описаны в таблице 2 примера 1.

Еще одним наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения являются бактерии *Mannheimia haemolytica*, депонированные под регистрационным номером ATCC No. РТА-3669. Эти бактерии дополнительно описаны в таблице 1 примера 1.

Результаты тестов, приведенных в разделах А и Б в примерах (таблицы 1, 2 и 3), подтверждают, что бактерии BIV-4895; ATCC No. РТА-3667 и BIV-AVICOR; ATCC No. РТА-3668 принадлежат к семейству *Pasteurella trehalosi* (*Pasteurella trehalosi*, которые являются позитивными в отношении трегалозы и негативными в отношении арабинозы), в то время как бактерии BIV-07990; ATCC No. РТА-3669 принадлежат к семейству *Mannheimia* (*Mannheimia haemolytica*, которые являются негативными в отношении трегалозы и негативными в отношении арабинозы).

Изобретение относится также к микробиологической культуре, которая содержит бактерии по изобретению, как они описаны выше. Культуру можно получать, выращивая эти бактерии при температуре 35-37°C. Бактерии можно выращивать при нормальном атмосферном давлении кислорода. Бактерии можно выращивать в широком разнообразии различных, в зависимости от общей задачи, усиливающих рост бактерий средах, которые известны специалисту в данной области, таких как триптозный бульон (ТВ), триптиказеин-соевый бульон или бульон с сердечно-мозговым экстрактом или любые обогащенные среды. Бактерии можно выращивать также на агаре с овечьей кровью, инкубированном при 37°C в течение 24 ч.

В данной области известны различные физические и химические методы инактивации бактерий. Физическую инактивацию можно осуществлять, например, с помощью УФ-излучения, рентгеновского излучения, гамма-излучения и нагревания. Примерами инактивирующих химических соединений являются бета-пропиолактон, глутаровый альдегид, бета-этиленимин и формальдегид.

Предпочтительно бактерии, описанные в изобретении, инактивируют формальдегидом. При создании изобретения неожиданно было установлено, что применение формальдегида в конечной концентрации 0,2% является очень хорошим методом инактивации бактерий, описанных в изобретении.

Таким образом, еще одним важным объектом изобретения является способ инактивации бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, который заключается в применении формальдегида в конечной концентрации 0,2%.

Под объем настоящего изобретения подпадают бактерии, описанные в изобретении, инактивированные указанными выше методами и другими методами инактивации бактерий, которые известны специалисту в данной области. Таким образом, еще одним важным объектом изобретения являются инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые можно получать с помощью способа, предлагаемого в изобретении, или метода, известного в данной области. Предпочтительно инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, выбирают из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. РТА-3669.

Таким образом, еще одним важным объектом изобретения являются живые ослабленные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые можно получать с помощью метода, известного в данной области. Предпочтительно эти живые ослабленные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, выбирают из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3668 *Mannheimia haemolytica* ATCC No. РТА-3669. Бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, ослабляют путем многих пассажей в соответствующих культуральных средах или с помощью любого другого метода, известного в данной области.

В контексте настоящего описания под понятием «инактивированный» подразумевается, что бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, погибают и не могут реплицироваться, вызывая клиническое заболевание.

В контексте настоящего описания под понятием «ослабленный» подразумевается, что бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в

изобретении, представляют собой живые бактерии, которые могут реплицироваться, но не вызывают при этом клиническое заболевание.

Еще одним важным объектом изобретения являются фракции или фрагменты бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые можно получать с помощью метода, известного в данной области. Фрагменты можно получать солиubilизацией бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, с использованием детергента или с помощью любого другого метода, известного в данной области.

Предпочтительно фракции или фрагменты представляют собой очищенные антигены бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении. Предпочтительно фракции/фрагменты представляют собой протеины наружной мембраны бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении.

Понятие «фрагмент» в контексте настоящего описания обозначает любую иммуногенную субъединицу бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, т.е. любой поднабор полипептидов.

Таким образом, изобретение относится к фрагментам, содержащим по меньшей мере один антиген бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении. Наиболее предпочтительно фрагменты содержат по меньшей мере один антиген бактерии, выбранной из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. РТА-3669. Фрагмент может представлять собой всю бактериальную клетку указанного(ых) штамма(ов), бактериальные экстракты, фракции наружных мембран, бактериальные экзо- и/или эндотоксины и очищенные протеины. Антигенные полипептиды или их фрагменты можно получать, например, из очищенных бактериальных протеинов или путем экспрессии соответствующего генетического продукта в некоторых прокариотических или эукариотических системах экспрессии или путем химического органического синтеза. Указанные методы хорошо известны специалисту в данной области.

Изобретение относится также к живым, и/или живым ослабленным, и/или инактивированным бактериям *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанным в изобретении, и/или фракциям *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, предназначенным для применения в виде вакцин.

Изобретение относится также к вакцине, полученной из описанных выше впервые идентифицированных бактерий. Таким образом, изобретение относится также к композиции вакцины, которая содержит живые, и/или живые ослабленные, и/или инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и/или фракции *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*.

В контексте настоящего описания понятие «вакцина» подразумевает вакцину для применения в ветеринарии, которая содержит антигенные субстанции и которую вводят с целью индукции специфического и активного или пассивного иммунитета против заболевания, вызываемого бактериями *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Живые или живые ослабленные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, обуславливают активный иммунитет, который может пассивно переноситься через антитела матери и проявлять действие в отношении иммуногенов, которые они содержат, и иногда в отношении организмов, родственных антигену. Инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi*,

и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и/или фракции *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica* обуславливают пассивный иммунитет.

Дополнительные компоненты, предназначенные для усиления иммунного ответа, представляют собой ингредиенты, которые обычно называют адьювантами, например, типа гидроксида алюминия, минеральных или других масел или вспомогательных молекул, добавляемых в вакцину или образовавшихся в организме после соответствующей индукции такими дополнительными компонентами, которые включают (но не ограничиваясь ими) интерфероны, интерлейкины или факторы роста.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения вакцина содержит инаktivированные бактерии.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в изобретении, относится к указанным выше вакцинам, в которых один иммунологически активный компонент представляет собой живые бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Понятие «живая вакцина» относится к вакцине, которая содержит частицу, обладающую способностью к делению/размножению.

Предпочтительно также вакцина, предлагаемая в изобретении, содержит ослабленные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Эту вакцину можно вводить в качестве объединенной вакцины, содержащей два или большее количество штаммов живых, и/или живых ослабленных, и/или инаktivированных бактерий *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, и/или фракций двух или большего количества штаммов *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*. Наиболее предпочтительно живые, и/или живые ослабленные, и/или инаktivированные бактерии *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и/или фракции *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica* в вакцине выбирают из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. PTA-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. PTA-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. PTA-3669.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в изобретении, содержит также инаktivированные бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Вакцину можно вводить также в виде объединенной вакцины, содержащей два или большее количество штаммов инаktivированных бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*.

Кроме того, в качестве приемлемого иммуногена в вакцине, предлагаемой в изобретении, можно применять также фракции целых клеток. При этом предпочтительно вакцина, предлагаемая в изобретении, содержит фракции бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Такую вакцину можно вводить также в виде объединенной вакцины, содержащей два или большее количество штаммов инаktivированных бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. В частности, изобретение относится к вакцинам, содержащим фрагменты, которые несут по меньшей мере один антиген бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении. Наиболее предпочтительно изобретение относится к вакцинам, содержащим фрагменты, которые несут по меньшей мере один антиген бактерий, выбранных из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. PTA-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. PTA-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. PTA-3669. Указанный фрагмент может содержать целые

бактериальные клетки, бактериальные экстракты, фракции наружных мембран, бактериальные экзо- и/или эндотоксины и очищенные протеины. Антигенные полипептиды или их фрагменты можно получать, например, из очищенных бактериальных протеинов или путем экспрессии соответствующего генетического продукта в некоторых прокариотических или эукариотических системах экспрессии или путем химического органического синтеза. Указанные методы известны специалисту в данной области.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в изобретении, содержит также адьювант. Таким образом, изобретение относится также к композиции вакцины, предлагаемой в изобретении, дополнительно содержащей один или несколько приемлемых адьювантов, и/или эксципиентов, и/или носителей.

Адьюванты, применяемые согласно изобретению, включают субстанции, которые вызывают бустер-иммунизацию животного, подвергаемого инъекции. В данной области известен целый ряд различных адьювантов. Применяемые согласно настоящему изобретению адьюванты включают полный и неполный адьювант Фрейнда, витамин Е, неионные блоксополимеры, мурамилдипептиды, Quil А, минеральное и не минеральное масло, растительное масло и карбопол (гомополимер). Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения вакцина, т.е. бактерии, содержит адьювант в виде эмульсии типа вода/масло. Такая вакцина, называемая также бактерином, содержит инактивированные (убитые) бактерии, описанные в изобретении, и адьювант в виде эмульсии типа вода/масло. Под объем настоящего изобретения подпадают также другие пути усиления свойств бактерий с помощью адьювантов, известные специалистам в данной области.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в изобретении, может содержать также один или несколько приемлемых эмульгаторов, например спан (Span) или твин (Tween).

Предпочтительно также живые, и/или живые ослабленные, и/или инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и/или фракции указанных бактерий *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica* в вакцине выбирают из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. РТА-3669.

Предпочтительно вакцина, предлагаемая в настоящем изобретении, содержит по меньшей мере один антиген бактерий, выбранных из группы, включающей *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3667, *Pasteurella trehalosi* ATCC No. РТА-3668 и/или *Mannheimia haemolytica* ATCC No. РТА-3669. Вакцина может содержать целые бактериальные клетки указанного(ых) штамма(ов), бактериальные экстракты, фракции наружной мембраны, бактериальные экзо- и/или эндотоксины и очищенные протеины. Антигенные полипептиды или их фрагменты можно получать, например, из очищенных бактериальных протеинов или путем экспрессии соответствующего генетического материала в некоторых прокариотических или эукариотических системах экспрессии или путем химического органического синтеза. Такие методы известны специалистам в данной области.

Наиболее предпочтительно изобретение относится также к композиции вакцины, предлагаемой в изобретении, которая дополнительно содержит по меньшей мере еще один антиген вируса или микроорганизма, патогенного для домашней птицы. Предпочтительно этот антиген находится в форме живых, ослабленных или инактивированных вирусов, или микроорганизмов, или их фрагментов. Фрагмент

может содержать целые бактериальные клетки или вирусные частицы, бактериальные экстракты, вирусные антигены, вирусные субъединицы, фракции наружной мембраны, бактериальные экзо- и/или эндотоксины и очищенные протеины. Антигенные полипептиды или их фрагменты можно получать, например, из очищенных бактериальных протеинов или путем экспрессии соответствующего генетического материала в некоторых прокариотических или эукариотических системах экспрессии или путем химического органического синтеза. Такие методы известны специалистам в данной области.

Наиболее предпочтительно изобретение относится также к композиции вакцины, предлагаемой в изобретении, которая дополнительно содержит по меньшей мере еще один антиген вируса или микроорганизма, патогенного для домашней птицы, где вирус или микроорганизм представляет собой (но не ограничиваясь ими) вирус инфекционного бронхита, вирус ньюкаслской болезни, вирус инфекционного бурсита птиц (заболевание: Гумборо (Gumboro)), вирус анемии цыплят, птичий реовирус, *Mycoblasma gallisepticum*, вирус птичьей пневмонии, *Haemophilus paragallinarum* (заболевание: Кориза (Coryza)), вирус оспы птиц, вирус птичьего энцефаломиелита, *Pasteurella multocida* E. coli.

«Фармацевтическая композиция» прежде всего содержит один или несколько ингредиентов, которые могут модифицировать физиологические, например иммунологические, функции организма, в который ее вводят, или организмов, которые живут в этом организме или на нем. Понятие включает (но не ограничиваясь ими) антибиотики или антипаразитические агенты, а также другие составляющие, которые обычно применяют для достижения определенной цели, такие как (но не ограничиваясь ими) характеристики процессинга, стерильность, стабильность, пригодность для введения композиции посредством энтерального или парентерального путей, например пероральным, внутриназальным, внутривенным, внутримышечным, подкожным, внутрикожным или другим приемлемым путем, толерантность после введения, способность к контролируемому высвобождению. Таким образом, другим важным объектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая живые, и/или живые ослабленные, и/или инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, описанные в изобретении, и/или фракции бактерий *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*.

Изобретение относится также к способу лечения животных, которые относятся к домашней птице, инфицированных *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* (например, инфицированных живыми указанными выше бактериями), заключающийся в том, что живые, ослабленные, инактивированные бактерии *Pasteurella trehalosi*, и/или *Mannheimia haemolytica*, и/или их фракции, и/или фрагменты по изобретению, как они описаны выше, вводят нуждающемуся в этом животному, относящемуся к домашней птице, в пригодных дозах, которые известны специалистам в данной области, и оценивают уменьшение симптомов, вызванных заражением *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Такое лечение предпочтительно можно повторять.

Еще одним важным вариантом осуществления изобретения является способ иммунизации домашней птицы против заболевания дыхательных и половых путей, вызванного бактериями *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* (например, описанными выше живыми бактериями), который заключается во введении иммунологически эффективного количества вакцины, предлагаемой в изобретении, и оценке уменьшения симптомов, вызванных заражением бактериями *Pasteurella trehalosi*

и/или *Mannheimia haemolytica*.

Следующим важным вариантом осуществления изобретения является применение инактивированных бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, и/или живых бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, и/или живых ослабленных бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, и/или фрагментов или фракций бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении, для приготовления вакцины для профилактики инфекций, вызываемых бактериями *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*.

Изобретение относится также к способу диагностики заболевания, включающему стадии получения образца из организма домашней птицы, где образец выбирают из группы, включающей кровь, сыворотку, плазму, тканевые соскобы, смывы, мазки, ткань, и анализа образца на присутствие бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, описанных в изобретении.

Согласно предпочтительному варианту осуществления наличие бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* определяют с помощью иммунологического теста. Для проведения иммунологического теста применяют моноклональные антитела или поликлональную антисыворотку, специфическую к бактериям *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Получение моноклональных антител известно в данной области (3, 4). Иммунологические тесты включают методы оценки, известные в данной области, такие как тест ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) или так называемый анализ сэндвич-ELISA, дот-блот анализ, иммуно-блот анализ, радиоиммунологические тесты (радиоиммунологический анализ, РИА), основанный на диффузии тест Оухтерлони или «ракетные» иммунофлуоресцентные анализы или реакции агглютинации (экспресс-реакции агглютинации на планшете или микропланшете). Другой иммунологический анализ представляет собой так называемый Вестерн-блот-анализ (называемый также перенос по Вестерну или Вестерн-блоттинг). Анализ методом Вестерн-блоттинга предусматривает перенос протеинов или полипептидов, разделенных с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозный фильтр или другой приемлемый носитель с одновременным сохранением относительных положений протеинов или полипептидов, полученных из гелей для электрофореза. Затем Вестерн-блот инкубируют с антителом, которое специфически связывается с рассматриваемым протеином или полипептидом. Эти методы обнаружения может использовать обычный специалист в данной области при осуществлении описанного изобретения. Литературные ссылки, в которых специалист может обнаружить описание вышеуказанных методов, а также другие методы обнаружения перечислены в: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, изд-во Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock и др., Techniques in Immunocytochemistry, изд-во Academic Press, Orlando, FL том 1 (1982), том. 2 (1983), том. 3 (1985); Tijssen, изд-во Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985).

Согласно другому наиболее предпочтительному варианту осуществления изобретения указанный выше образец инкубируют с антителами, специфическими для бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, и определяют наличие образовавшегося при этом комплекса антиген/антитело.

Согласно особенно предпочтительному варианту способа, предлагаемого в изобретении, присутствие бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* в указанном выше образце определяют с помощью методов молекулярной биологии. В

контексте настоящего описания под методами молекулярной биологии понимают методы обнаружения, которые, например, включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) или Нозерн- или Саузерн-блоттинг, эти методы специалист в данной области может
5 обнаружить в стандартных руководствах (например, Sambrook и др. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York и Bertram, S. и Gassen, H.G. *Gentechnische Methoden*, изд-во G.Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991).

10 Изобретение относится также к диагностическому тест-набору, предлагаемому в изобретении, который отличается тем, что содержит все необходимые элементы для обнаружения бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*.

15 Диагностический тест-набор представляет собой набор, содержащий все компоненты для осуществления способа диагностики, предлагаемого в изобретении. В качестве некоторых примеров (но не ограничиваясь ими) других элементов, предназначенных для осуществления способа, предлагаемого в изобретении, можно указать контейнеры, такие как 96-луночные или титрационные микропланшеты, лабораторные пробирки, другие пригодные контейнеры, поверхности и субстраты,
20 мембраны, такие как нитроцеллюлозный фильтр, реагенты для отмывки и буферы. Диагностический тест-набор может содержать также реагенты, которые могут выявлять связанные антитела, такие, например, как меченые вторичные антитела, хромофоры, ферменты (например, конъюгированные с антителами) и их субстраты или другие субстанции, которые могут связываться с антителами.

25 Изобретение относится также к диагностическому тест-набору, предлагаемому в изобретении, который отличается тем, что он содержит все необходимые элементы для осуществления ПЦР или ОТ-ПЦР с целью обнаружения ДНК или РНК, специфических для бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Такой набор может
30 содержать (но не ограничиваясь ими) помимо лабораторных пробирок или 96-луночных планшетов, или титрационных микропланшетов, других приемлемых контейнеров, поверхностей и субстратов, мембран, таких как нитроцеллюлозные фильтры, буферов для отмывки и реакционных буферов (которые могут отличаться по значениям рН и концентрациям магния), стерильную воду, минеральное масло, БСА (бычий сывороточный альбумин), $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, ДМСО
35 (диметилсульфоксид), меркаптоэтанол, нуклеотиды (дНТФ), ферменты, такие как Taq-полимераза и обратная транскриптаза, и в качестве ДНК-матрицы ДНК или кДНК, специфическую для бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*,
40 специфические для ДНК или РНК бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, контрольную матрицу, DEPC-воду, ДНКазу, РНКазу и другие соединения, известные специалисту в данной области. Олигонуклеотиды, предлагаемые в изобретении, представляют собой короткие молекулы нуклеиновых кислот, длиной от
45 примерно 15 до примерно 100 нуклеотидов, которые связываются в строгих условиях с нуклеотидной последовательностью, комплементарной последовательности протеина бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*. Под строгими условиями специалист в данной области понимает условия, которые позволяют отбирать последовательности, гомологичные более чем на 85%, предпочтительно более чем
50 на 90% (ср. Sambrook и др. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2-е изд., изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, и Bertram S. и Gassen H.G. *Gentechnische Methoden*, изд-во G.Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991).

Ниже изобретение более подробно проиллюстрировано на примерах, которые не

ограничивают его объем.

Пример 1

Вспышки в полевых условиях заболеваний, связанных с бактериями *Pasteurella trehalosi* и *Mannheimia haemolytica*

Клинические симптомы

По результатам полевых исследований

Несушки	Бройлеры
Слабое поражение верхних дыхательных/половых путей	Серьезное поражение верхних дыхательных/половых путей
Возраст: 22 недели	Возраст: 7 недель
Выделения из носа	Чиханье с хрипом
Опухшие области вокруг глаза	Опухшая голова

Несушки	Бройлеры
Сниженное потребление корма	Сниженное потребление корма
Беловатая диарея	Депрессия
Сниженное производство яиц	Не однородный рост
Невысокий уровень смертности	Сложенные крылья
Опущенный гребешок	Прострация
Цианоз гребешка	Смертность 8%

Серьезные поражения	
Атрофия яичников, сопровождающаяся кровотечениями и регрессом	Кровотечения в гонадах
Деформация яичниковых фолликул	Кровотечения в верхней области трахей
Увеличенная печень	Увеличенная печень с признаками кровотечений
Воспаление почек	Аэросаккулит
Кровотечения в брюшной жировой клетчатке	Увеличенная селезенка с признаками кровотечений
Кровотечения в грудной полости	Кровотечения в мышечной ткани
Кровотечения в яйцеводе	Кровотечения в сердце и водянка перикарда
Кровотечения в коронарной жировой клетчатке	Кровотечения в грудной полости

Три штамма грамотрицательных, факультативно анаэробных, плеоморфных имеющих форму палочек бактерий нового типа были депонированы в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 1081, University Boulevard, Манассас, шт. Виргиния 20110 - 2209, США, под регистрационными номерами: ATCC No. PTA - 3667 для штамма *Pasteurella trehalosi* BIV-4985; ATCC No. PTA-3668 для штамма *Pasteurella trehalosi* BIV-AVICOR и ATCC No. PTA-3669 для штамма *Mannheimia haemolytica* BIV-07990. Дата депонирования 22 августа 2001 г.

Депонированные бактерии типировали с помощью стандартных методов оценки на основе руководства Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, том I (1984, Williams и Wilkins, 428 East Preston Street Baltimore, USA).

Таблица 1

Mannheimia haemolytica: BIV-07990 (биотип 1); ATCC No. PTA-3669

Макроскопическая морфология

Колонии, выращенные на агаре с добавлением овечьей крови в течение 24 ч, диаметром 1,0-1,5 мм, яркие полупрозрачные, слабовыпуклые, гладкие и кремообразные, β-гемолиз.

Микроскопическая морфология

Грамотрицательные, неподвижные, плеоморфные палочки, часто имеющие биполярное окрашивание.

Биохимические и другие тесты

Раздел А

Тест	Реакция
5 Оксидаза	+
Каталаза	+
Индол	-
Глюкоза	+
Сахароза	+
10 MacConkey	+
Уреаза	-
Нитраты	+

Раздел Б

15 Мальтоза	+
Маннит	+
Арабиноза	-
Целобиоза	-
Сорбит	+
20 Ксилоза	+
Трегалоза	-
Салицин	-
Орнитин	-
Эскулин	-
25 β -глюкозидаза	-
α -фукозидаза	-
β -галактозидаза	+

Таблица 2

30 *Pasteurella trehalosi* BIV-AVICOR (биотип 2); ATCC No. PTA-3668

Макроскопическая морфология

Колонии, выращенные на агаре с добавлением овечьей крови в течение 24 ч, диаметром 1,0-1,5 мм, яркие полупрозрачные, слабовыпуклые, гладкие и кремообразные, β -гемолиз.

35 Микроскопическая морфология

Грамотрицательные, неподвижные, плеоморфные палочки, часто имеющие биполярное окрашивание.

Биохимические и другие тесты

Раздел А

Тест	Реакция
40 Оксидаза	+
Каталаза	+
Индол	-
45 Глюкоза	+
Сахароза	+
MacConkey	+
Уреаза	-
Нитраты	+

50

Раздел Б

Мальтоза	+
Маннит	+

	Арабиноза	-
	Целобиоза	-
	Сорбит	+
	Ксилоза	+
5	Трегалоза	+
	Салицин	-
	Орнитин	-
	Эскулин	-
	β -глюкозидаза	+*
10	α -фукозидаза	-
	β -галактозидаза	+
	* 80% позитивны	

Таблица 3

Pasteurella trehalosi: BIV-4895 (биотип 4); ATCC No. PTA-3667

15 Макроскопическая морфология

Колонии, выращенные на агаре с добавлением овечьей крови в течение 24 ч, диаметром 1,0-1,5 мм, яркие полупрозрачные, слабовыпуклые, состоящие из частиц и сухие, β -гемолиз.

20 Микроскопическая морфология

Грамотрицательные, неподвижные, плеоморфные палочки, часто имеющие биполярное окрашивание.

Биохимические и другие тесты

Раздел А

Тест	Реакция
Оксидаза	+
Каталаза	+
Индол	-
30 Глюкоза	+
Сахароза	+
MacConkey	+
Уреаза	-
Нитраты	+

35 Раздел Б

	Мальтоза	-
	Маннит	+
	Арабиноза	-
40	Целобиоза	-
	Сорбит	+
	Ксилоза	+
	Трегалоза	+
	Салицин	-
45	Орнитин	-
	Эскулин	-
	β -глюкозидаза	-
	α -фукозидаза	-
	β -галактозидаза	+

50 Результаты тестов, представленные в разделах А и Б (таблицы 1, 2 и 3), подтверждают, что бактерии штамма BIV- 4895; ATCC No. PTA-3667 и штамма BIV-AVICOR; ATCC No. PTA-3668 принадлежат к семейству *Pasteurella trehalosi* (*Pasteurella trehalosi*, они являются позитивными в отношении трегалозы и

негативными в отношении арабинозы), в то время как бактерии штамма BIV-07990; ATCC No. PTA-3669 принадлежат к семейству Mannheimia (*Mannheimia haemolytica*, они являются негативными в отношении трегалозы и негативными в отношении арабинозы).

5 Идентификация возбудителя

Бактерии выделяли из зараженный трахей, небной щели, яичника, печени, сердца, почки и гонад (бройлеры). На основе указанных ниже тестов они идентифицированы как *Pasteurella trehalosi* и *Mannheimia haemolytica*:

10	Бета-гемолиз	+
	Окраска по Граму	-
	Оксидаза	+
	Каталаза	+
	MacConkey	+
15	Уреаза	-
	Нитраты	+
	Индол	-

Не выделено вирусов или каких-либо других бактерий.

20 Биотипирование:

Бактериальные изоляты очищали и биотипировали согласно методу, описанному у Jaworski и др. (1). Было выявлено 3 различных биотипа (4, 2, 1).

25 В целом метод состоит в следующем: из очищенных изолятов индивидуальной колонией инокулировали пробирки, содержащие по 3 мл трипозного бульона, и инкубировали при 37°C в течение 8 ч. Петлей брали инокулят (20 мкл) из пробирки и затем переносили в другую пробирку, подлежащую тестированию, которая содержала 3 мл 1%-ного сахара, и инкубировали в течение 7 дней при 37°C до оценки результатов.

30 Модель контрольного заражения:

После очистки бактерий изоляты выращивали в трипозных средах, получая большие количества чистых патогенов. Для подтверждения постулата Коха три различные группы (по 20 птиц в каждой группе) не содержащих специфический патоген (SPF) цыплят возрастом 13 недель заражали внутривенно бактериями каждого биотипа (0,2 мл /птицу; 3×10^8 КОЕ/мл). Птиц обследовали ежедневно в течение 3 дней в отношении заболеваемости и смертности. К концу третьего дня всех птиц умерщвляли, после вскрытия трупов оценивали повреждения и образцы органов (печень и гонады) брали для повторного выделения. Также анализировали повреждения после вскрытия трупов погибших своей смертью птиц.

Результаты

Клинические симптомы: прострация, хромота, опущенный гребешок, сложенные крылья, цианоз верхушки гребешка.

45 Поражения:

Поражение	BIV-4895 (биотип 4)	BIV-Avicor (биотип 2)	BIV-07990 (биотип 1)
Отек сердца	73%	37%	90%
Кровотечения в сердце	90%	---	70%
50 Кровотечения в коронарной жировой клетчатке	90%	37%	50%
Перикардит	73%	46%	30%
Кровотечения в грудной полости	---	19%	40%
Кровотечения в яичнике	64%	9%	20%

Воспаление почек	64%	46%	60%
Кровотечения в почках	55%	46%	20%
Увеличенная печень с признаками кровотечений		73%	---
Аэросаккулит	64%	---	---
Кровотечения в мышце	---	37%	---
Смертность	46%	19%	---

Пример II

Выращивание бактерий, описанных в изобретении, получение вакцины и вакцинация SPF-птиц

Штаммы выращивали на триптозном бульоне (ТВ). Сбор осуществляли на логарифмической фазе роста примерно через 6-8 ч после инокуляции в зависимости от штамма. Считывание планшета осуществляли титрованием на агаре с овечьей кровью. Определяли количество колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл), используя разбавления сбора 1:10. Клетки убивали, добавляя формальдегид до конечной концентрации 0,2%. После оценки стерильности этой суспензии к конечной вакцине добавляли минимальный титр, составляющий 10 КОЕ/мл.

Вакцину получали смешением двух штаммов (BIV-4895, ATCC No. PTA-3667 и BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668) и масляного адьюванта (эмульсия типа вода/масла на основе минерального масла с соотношением 60% масла/40% воды) до минимальной концентрации $10^{7,0}$ КОЕ/штамма/мл.

Не содержащих специфический патоген (SPF) цыплят вакцинировали в возрасте 2, 5 и 9 недель путем инъекции 0,5 мл вакцины подкожно в область, расположенную на середине длины шеи.

Пример III

Получение штаммов для контрольного заражения и заражение вакцинированных и контрольных групп

Бактериальные штаммы BIV-4895, ATCC No. PTA-3667 и BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668 выращивали на агаре с овечьей кровью в течение 24 ч при 37°C. Клетки собирали в триптозном бульоне (ТВ) до достижения оптической плотности суспензии 2,0, используя спектрофотометр с длиной волны 540 нм. Для контрольного заражения готовили препараты, содержащие следующее количество клеток в конечном объеме пробы для контрольного заражения:

3×10^9 КОЕ/мл BIV-AVICOR; ATCC No. PTA-3668

$1,45 \times 10^{10}$ КОЕ/мл BIV-4895; ATCC No. PTA-3667

Заражали 20 вакцинированных и 20 ревакцинированных птиц возрастом 13 недель путем внутривенного введения 0,2 мл инокулята (по меньшей мере $10^{8,0}$ КОЕ/особь). Птиц обследовали в течение 3 дней в отношении признаков заболевания и оценивали их смертность. После трехдневного обследования всех оставшихся в живых птиц умерщвляли и у каждой птицы повторно выделяли бактерии из печени и гонад. Также осуществляли посмертную оценку погибших птиц.

Результаты			
Группы птиц	Инокулят для заражения	Данные, полученные для погибших птиц и после повторного выделения органов выживших	Защитное действие, %
Отрицательный контроль	Нет	0	Не применимо
Положительный контроль	ATCC No.PTA-3667	77	23
Вакцинированный положительный контроль	ATCC No.PTA-3668	54	46

Вакцинированная	ATCC No.PTA-3667	0	10
Вакцинированная	ATCC No.PTA-3668	5	95

Пример IV

5 Выращивание бактерий, описанных в изобретении, получение вакцины и вакцинация SPF-птиц

Штаммы выращивали на триптозном бульоне (ТВ). Сбор осуществляли на логарифмической фазе роста примерно через 6-8 ч после инокуляции в зависимости от штамма. Считывание планшета осуществляли титрованием на агаре с овечьей кровью. 10 Определяли количество колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл), используя разбавления сбора 1:10. Клетки убивали, добавляя формальдегид до конечной концентрации 0,2%. После оценки стерильности этой суспензии к конечной вакцине добавляли минимальный титр, составляющий 10 КОЕ/мл.

15 Вакцину получали смешением трех штаммов (BIV-4895, ATCC No. PTA-3667, BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668 и BIV-07990, ATCC No. PTA-3669) и масляного адьюванта (эмульсия типа вода/масла на основе минерального масла с соотношением 60% масла/40% воды) до минимальной концентрации $10^{7,0}$ КОЕ/штамма/мл.

20 Не содержащих специфический патоген (SPF) цыплят вакцинировали в возрасте 2, 5 и 9 недель путем инъекции 0,5 мл вакцины подкожно в область, расположенную на середине длины шеи.

Пример V

25 Получение штаммов для контрольного заражения и заражение вакцинированных и контрольных групп

Бактериальные штаммы BIV-4895, ATCC No. PTA-3667, BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668 и BIV-07990, ATCC No. PTA-3669 выращивали на агаре с овечьей кровью в течение 24 ч при 37°C. Клетки собирали в триптозном бульоне (ТВ) до достижения 30 оптической плотности суспензии 2,0, используя спектрофотометр с длиной волны 540 нм. Для контрольного заражения готовили препараты, содержащие следующее количество клеток в конечном объеме пробы для контрольного заражения:

8,3×10⁹ КОЕ/мл BIV-AVICOR; ATCC No. PTA-3668

35 2,2×10⁹ КОЕ/мл BIV-4895; ATCC No. PTA-3667

1,0×10¹⁰ КОЕ/мл BIV-07990, ATCC No. PTA-3669

Заражали 20 вакцинированных и 20 невакцинированных птиц возрастом 13 недель путем внутривенного введения 0,2 мл инокулята (по меньшей мере $10^{8,0}$ КОЕ/особь). 40 Птиц обследовали в течение 3 дней в отношении признаков заболевания и оценивали их смертность. После трехдневного обследования всех оставшихся в живых птиц умерщвляли и у каждой птицы повторно выделяли бактерии из печени и гонад. Также осуществляли посмертную оценку погибших птиц.

			Результаты
Группы птиц	Инокулят для заражения	Данные, полученные для погибших птиц и после повторного выделения органов выживших	Защитное действие (%)
Отрицательный вакцинированный контроль	Нет	0	Не применимо
50 Отрицательный не вакцинированный контроль	Нет	0	Не применимо
Вакцинированная	ATCC No.PTA-3669	27,3	72,7
Вакцинированная	ATCC No.PTA-3668	20,9	79,1
Вакцинированная	ATCC No.PTA-3667	16,7	83,7

Положительный контроль	ATCC No. PTA-3669	53,3	46,7
Положительный контроль	ATCC No. PTA-3668	53,3	46,7
Положительный контроль	ATCC No. PTA-3667	64,3	35,7

5 Серологический тест

Гипериммунную сыворотку получали в кроликах с помощью репрезентативного для каждого биотипа изолята согласно методу Viberstein и др. (2).

10 Изоляты выращивали в течение ночи на кровяном агаре, затем собирали в физиологический раствор, содержащий 0,3% формалина. Клетки однократно промывали и для инъекции доводили коэффициент пропускания до 10% при длине волны 575 нм. Введение осуществляли с помощью внутривенной инъекции (IV) согласно следующей схеме:

15 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 3,0, 3,0 мл с 4-дневными интервалами и у всех кроликов брали образцы крови через 4 дня после последней инъекции.

Гипериммунную сыворотку тестировали в отношении ее специфичности с использованием штаммов 3 биотипов и оценивали реакцию с гомологичной и гетерологичной кроличьей антисывороткой (2-кратные разбавления) с помощью метода быстрой агглютинации на планшетах.

20 Антисыворотку каждого биотипа разбавляли до тех пор, пока не определяли конечный титр, дающий положительный ответ, устанавливая тем самым наибольшее возможное разбавление.

Разбавление (\log^2)

25 Антигенный биотип 1

Антисыворотка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

30

Разбавление (\log^2)

Антигенный биотип 4

Антисыворотка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

35

Разбавление (\log^2)

40 Антигенный биотип 2

Антисыворотка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

45

Специфическую для биотипа гипериммунную сыворотку затем применяли в качестве положительного контроля при осуществлении серологической реакции агглютинации на микропланшете.

50 Пример VI

Получение штаммов для контрольного заражения и заражение вакцинированных и контрольных групп

Бактериальные штаммы BIV-4895, ATCC No. PTA-3667, BIV-AVICOR, ATCC No.

РТА-3668 и ВІV-07990, АТСС No. РТА-3669 выращивали на агаре с овечьей кровью в течение 24 ч при 37°C. Клетки собирали в трипозном бульоне (ТВ) до достижения оптической плотности суспензии 2,0, используя спектрофотометр с длиной волны 540 нм. Для контрольного заражения готовили препараты, содержащие следующее

1,5×10¹⁰ КОЕ/мл ВІV-AVICOR; АТСС No. РТА-3668

1,7×10¹⁰ КОЕ/мл ВІV-4895; АТСС No. РТА-3667

1,6×10¹⁰ КОЕ/мл ВІV-07990, АТСС No. РТА-3669

Заражали 20 вакцинированных и 20 невакцинированных птиц возрастом 13 недель путем внутривенного введения 0,2 мл инокулята (по меньшей мере 10^{8,0} КОЕ/особь). Птиц обследовали в течение 3 дней в отношении признаков заболевания и оценивали их смертность. После трехдневного обследования всех оставшихся в живых птиц умерщвляли и у каждой птицы повторно выделяли бактерии из печени, сердца и гонад.

Результаты

Таблица 1			
Оценка активности вакцины на основе данных о смертности и данных, полученных после повторного выделения органов выживших птиц			
Группы птиц	Инокулят для заражения	Данные, полученные для погибших птиц и после повторного выделения органов выживших	Защитное действие, %
Отрицательный невакцинированный контроль	Нет	Нет	Не применимо

Группы птиц	Инокулят для заражения	Данные, полученные для погибших птиц и после повторного выделения органов выживших	Защитное действие, %
Положительный контроль	ВІV-4895	70	30
Положительный контроль	ВІV-AVICOR	80	20
Положительный контроль	ВІV-07990	88,8	11,2
Вакцинированная	ВІV-4895	10	90
Вакцинированная	ВІV-AVICOR	10	90
Вакцинированная	ВІV-07990	15	85

Таблица 2			
Оценка активности вакцины на основе данных о выраженных повреждениях после контрольного заражения			
Группы птиц	Инокулят для заражения	Повреждения, %	Защитное действие, %
Отрицательный невакцинированный контроль	Нет	Нет	Не применимо
Положительный контроль	ВІV-4895	74,4	25,6
Положительный контроль	ВІV-AVICOR	27,0	73,0
Положительный контроль	ВІV-07990	7,0	93,0
Вакцинированная	ВІV-4895	4,0	96,0
Вакцинированная	ВІV-AVICOR	1,1	99,0
Вакцинированная	ВІV-07990	2,4	98,0

Источники информации

1. Jaworski M.D., D.L.Hunter, A.C.S.Ward. Biovariants of isolates of Pasteurella from domestic и wild ruminants. J. Vet. Invest. 10, 1988, сс.49-55.

2. Biberstein E.L., Meyer M.E. and Kenedy P.C. Colonial variation of Pasteurella haemolytica isolated from sheep. J. Bact. 76, 1958, сс.445-452.

3. Kearney J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell

lines. J. Immunol. 123, 1979, cc.1548-1550.

4. Köhler G., Milstein C. Continuous culture effused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 265, 1975, cc.495-497.

5

Формула изобретения

1. Способ обнаружения бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* у домашней птицы, который включает стадии:

а) получения образца из организма домашней птицы, где образец выбирают из группы, включающей кровь, сыворотку, плазму, тканевые соскобы, смывы, мазки, ткань;

б) инкубирование указанного образца с антителами, специфичными в отношении бактерий, выбранных из группы *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые депонированы под регистрационными номерами АТСС № РТА-3667, АТСС № РТА-3668, АТСС № РТА-3669 для образования комплекса антиген-антитело, включающего бактерии *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, присутствующие в образце, и антитело, которое используется для инкубации;

в) определение наличия комплекса антиген-антитело, образовавшегося на стадии (б).

2. Способ по п.1, где домашней птицей является курица.

3. Способ обнаружения бактерий *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica* у домашней птицы, который включает стадии:

а) отделение протеинов бактерий, выбранных из группы *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые депонированы под регистрационными номерами АТСС № РТА-3667, АТСС № РТА-3668, АТСС № РТА-3669, с помощью геля электрофореза на полиакриламидном геле и перенос их на пригодный носитель;

б) инкубирование указанного образца с антителами, специфичными в отношении бактерий, выбранных из группы *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*, которые депонированы под регистрационными номерами АТСС № РТА-3667, АТСС № РТА-3668, АТСС № РТА-3669 для образования комплекса антиген-антитело, включающего *Pasteurella trehalosi* и/или *Mannheimia haemolytica*;

в) определение связывания антител с носителем.

35

40

45

50