

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 39/102 G01N 33/53
//(C12N1/20, C12R1 : 01)

[21] 申请号 02821251.7

[43] 公开日 2005 年 2 月 2 日

[11] 公开号 CN 1575334A

[22] 申请日 2002.10.24 [21] 申请号 02821251.7

[30] 优先权

[32] 2001.10.26 [33] DE [31] 10152307.6

[86] 国际申请 PCT/EP2002/011899 2002.10.24

[87] 国际公布 WO2003/037367 英 2003.5.8

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.26

[71] 申请人 贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡公司

地址 墨西哥哈利斯科州

[72] 发明人 玛丽亚·B·瓦兹奎兹

劳尔·坎波加里多

卡洛斯·冈萨雷斯-赫南德兹

韦萨纳塞恩·西瓦南登

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 50 页 附图 22 页

[54] 发明名称 新的导致禽病的细菌和由其衍生的疫苗

[57] 摘要

本发明属于动物健康领域，具体地是涉及一种新的细菌性禽病的致病因子，海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。本发明提供了所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌细菌，一种含有灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的疫苗，以及一种为防止鸡感染所述疾病而对鸡进行免疫的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种引发新的家禽上呼吸道及生殖道疾病的革兰氏阴性、兼性厌氧、多形性杆-状细菌，其中该细菌选自海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。
- 5 2. 海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的巴斯德氏菌和/或曼氏菌是 β 溶血-阳性，革兰氏-阴性，氧化酶-阳性，过氧化氢酶-阳性，脲酶-阴性，硝酸盐-阳性以及吲哚-阴性。
 3. 权利要求 2 中的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的巴斯德氏菌和/或曼氏菌为麦氏阳性。
- 10 4. 权利要求 2 或 3 中任一项的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的巴斯德氏和/或曼氏菌为葡萄糖-阳性，蔗糖-阳性，甘露醇-阳性，阿拉伯糖-阴性，纤维二糖-阴性，木糖-阳性，水杨苷-阴性，鸟氨酸-阴性，七叶苷-阴性， α -岩藻糖苷酶-阴性， β -半乳糖苷酶-阳性。
 5. 权利要求 2-4 中任一项所述的海藻巴斯德氏菌，其中所述的巴斯德氏菌为阿拉伯糖-阴性和海藻糖-阳性。
 - 15 6. 权利要求 2-4 中任一项所述的溶血性曼氏菌，其中所述的曼氏菌为阿拉伯糖-阴性和海藻糖-阴性。
 7. 权利要求 2-6 中任一项所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的禽类选自鸡、火鸡、鸭、鹅、dove, pigeon 或鹌鹑。
- 20 8. 一种保藏号为 ATCC No. PTA-3667 的海藻巴斯德氏菌。
 9. 一种保藏号为 ATCC No. PTA-3668 的海藻巴斯德氏菌。
 10. 一种保藏号为 ATCC No. PTA-3669 的溶血性曼氏菌。
 11. 灭活权利要求 1-10 中任一项所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的方法，其中包括使用福尔马林至终浓度为 0.2%。
- 25 12. 用权利要求 11 所述方法或本领域已知方法获得的灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。
 13. 权利要求 12 中的灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667, 海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC
 - 30 No. PTA-3669。
14. 一种活的减毒的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中权利要

求 1-10 中任一项所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌被减毒。

15. 权利要求 14 中的活的减毒的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

16. 含有权利要求 1-10 中任一项所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的至少一种抗原的片段或组分。

17. 权利要求 16 中的片段或组分，其中所述片段含有至少一种细菌抗原，该细菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

18. 疫苗组合物，其中含有权利要求 12 或 13 所述的灭活海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 1-10 中任一项所述的活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 14 或 15 所述的活的减毒的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 16 或 17 所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌片段或组分。

19. 权利要求 18 中的疫苗组合物，其进一步包含一种或多种合适的佐剂和/或赋形剂和/或载体。

20. 权利要求 18 或 19 中的疫苗组合物，含有灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌，其中所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

21. 权利要求 18-20 中任一项所述的疫苗组合物，其中所述疫苗组合物含有两株或多株权利要求 1-10 以及 12-15 所述活的、和/或活的减毒的、和/或灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 16 或 17 所述的两株或多株海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌组分。

22. 权利要求 18-21 中任一项所述的疫苗组合物，其中所述疫苗中的活的、和/或活的减毒的、和/或灭活的本发明海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

23. 权利要求 18-22 中任一项所述的疫苗组合物，进一步含有至少一种

其他的源自对禽类致病的病毒或微生物的抗原。

24. 权利要求 18-23 中任一项所述的疫苗组合物, 其中所述病毒或微生物选自传染性支气管炎病毒、新城疫病毒、传染性法氏囊病病毒、鸡传染性贫血因子、禽呼肠孤病毒、鸡败血枝原体、禽肺病毒、副鸡嗜血杆菌、
5 鸡痘病毒、禽脑脊髓炎病毒、多杀性巴氏杆菌或大肠杆菌。

25. 权利要求 12 或 13 所述的灭活海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 1-10 中任一项所述的活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 14 或 15 所述的活的减毒的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或权利要求 16 或 17 所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌片段
10 或组分在制备用于预防海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌感染的疫苗中的用途。

26. 免疫禽类抗由权利要求 1-10 中所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌所引发呼吸及生殖道疾病的方法, 包括免疫有效量的权利要求 18-24 中任一项所述疫苗, 和监测由所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌感染
15 引发症状的减轻情况。

27. 通过含有下述步骤来诊断所致疾病的方法, 从禽类获取样本, 其中所述样本选自血液、血清、血浆、组织刮取物、洗涤物、拭子、组织, 分析样本中权利要求 1-10 任一所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌存在。

28. 权利要求 27 中的方法, 其中所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌存在是通过免疫检测测定的。
20

29. 权利要求 27 中的方法, 其中所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌存在是通过分子生物学方法测定的。

30. 诊断试剂盒, 含有实施权利要求 27-29 中任一项所述方法所需的全部组件。

新的导致禽病的细菌和由其衍生的疫苗

5 发明领域

本发明属于动物健康领域，具体涉及一种新的细菌性禽病的致病因子 (Causative agent)，海藻巴斯德氏菌(Pasteurella trehalosi)和/或溶血性曼氏菌 (Mannheimia haemolytica)。本发明提供了所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌细菌，一种含有灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的疫苗，以及一种为防止鸡感染所述疾病而对鸡进行免疫的方法。

发明背景

在过去的十年中，为提高生产能力而采取的集约化禽类养殖方法使得所有主要禽类生产国的发病率升高。因而亟需新的更好的疫苗及接种方案来控制这类疾病。目前，多数动物都被免疫以抗多种病毒及细菌病源性疾病。

禽类病毒病的实例为新城疫(Newcastle)、传染性支气管炎(Infectious Bronchitis)、禽肺病毒(Avian Pneumovirus)、禽痘(Fowlpox)、传染性法氏囊病(Infectious Bursal Disease)等。

细菌性疾病的实例有由下面所导致的鸡鼻炎(Avian Coryza)、副鸡嗜血杆菌 (Haemophilus Paragallinarum)(上呼吸道)、鸟博德特氏菌 (Bordetella avium)(上呼吸道)、鼻腔鸟杆菌(ornithobacterium rhinotracheale)(下呼吸道)，沙门氏菌(Salmonella)感染(消化道)，多杀性巴氏杆菌(Pasteurella multocida)，其是禽霍乱(败血症的(Septicemic))致病因子，败血症以及大肠杆菌感染。

因此，本发明的首要技术问题是鉴定一种新的细菌性禽病，提供所述疾病的致病因子以及提供一种防止所述疾病的疫苗。

发明内容

说明书使用术语的定义：

在本发明的实施方案之前，必须注意的是本文及所附权利要求书中，除上下文清楚注明之外，其中使用的单数形式“一(“a”、“an”)”和“该(“the”)”将复

数情况包括在内。因此，例如，“一种海藻巴斯德氏菌”其中包括多个这样的海藻巴斯德氏菌，提到“该细胞”是指一个或多个细胞及其本领域技术人员已知的等价物，等。一个词大写与否没有区别，因此“Arabinose”和“arabinose”具有相同的含义。除非另有说明，本申请中使用的所有技术及科学术语的含义与本发明所属领域普通技术人员的常规理解相同。尽管与本申请所述方法及材料类似或等同的任一方法及材料都可以使用，但是本文描述了优选的方法、设备及材料。本申请中提到的所有出版物在此引入旨在描述及公开这些出版物中报道的与本发明有关的细胞系、载体及方法学。但是，本申请任何内容都不能理解为本申请由于使用了在前发明就使得本发明在时间上不能早于在前发明的公开内容。

令人惊奇的是，本发明人观察到了一种新的细菌性禽病，该病主要发生于蛋鸡，肉鸡中较少发生。已经接种了抗副鸡嗜血杆菌（鸡鼻炎(avian coryza)致病因子)及多杀性巴氏杆菌（禽霍乱致病因子）的小鸡出现了这种疾病。这种新的疾病的症状不同于鼻炎的特异性症状。如果这种新发现的疾病明显表现出下文所述的上呼吸道临床症状，则可以排除副鸡嗜血杆菌为致病因子的可能。

本发明的第一个实施方案涉及导致一种新的家禽上呼吸道及生殖道疾病的革兰氏阴性、兼性厌氧、多形性杆-状细菌，该细菌选自海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。

本发明所述细菌可分离自感染后的气管、腭裂、卵巢、肝、心、肾及生殖腺(肉鸡)。根据下列测试它们被鉴定为本发明的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌：

	β溶血	+
	革兰氏染色	-
25	氧化酶	+
	过氧化氢酶	+
	脲酶	-
	硝酸盐	+
	吲哚	-

30 该细菌分离物可以根据 Jaworski et al. (1)所述方法纯化并生物分型。该方

法还在实施例 中举例说明。细菌分类的重要方法有 DNA-DNA 杂交、REA (限制酶分析, 参见, 例如, J. Clinical Microbiol, 1993, 31 : 831-835) 以及核糖体分型。技术人员可以利用所述方法判明细菌是否在本发明范围之内。一种验证柯赫(koch)法则的攻击(challenge)模型也在实施例中例示说明。

5 因此, 本发明的一个重要实施方案是海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌, 其中所述的巴斯德氏和/或曼氏(Pasteurella and/or Mannheimia)菌是贝它(β)-溶血-阳性、革兰氏-阴性、氧化酶-阳性、过氧化氢酶-阳性, 脲酶-阴性、硝酸盐-阳性及吲哚-阴性。优选地, 本发明所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌也是麦氏(MacConkey)-阳性。甚至更优选的, 本发明所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌另外还是葡萄糖-阳性, 蔗糖-阳性, 甘露醇-阳性, 阿拉伯糖-阴性, 纤维二糖-阴性, 木糖-阳性, 水杨苷-阴性, 鸟氨酸-阴性, 七叶苷-阴性, α -岩藻糖苷酶-阴性, β -半乳糖苷酶-阳性。最优选的是本发明所述的海藻巴斯德氏菌, 其中该巴氏杆菌也是阿拉伯糖-阴性和海藻糖-阳性。还优选的是, 本发明所述的海藻巴斯德氏菌还为贝它(β)-葡萄糖苷酶-阴性或-10 阳性, 根据生物分型。另外最优选的是本发明所述的溶血性曼氏菌, 其中该曼氏菌进一步还是阿拉伯糖-阴性和海藻糖-阴性。还优选的是, 本发明所述的溶血性曼氏菌是 β -葡糖苷酶阴性。

本发明所述细菌的这些特征赋予了本发明所述细菌相对于其他已知细菌性禽病原体的新颖性(Diseases of Poultry, Tenth Edition, Edited by B. W.Calnek, Iowa State University Press, Iowa, U. S. A. 1997)。

20 本发明的另一优选实施方案是本发明所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌, 其中所述禽类选自鸡、火鸡、鸭、鹅、dove, pigeon 以及鹤鹑。

本发明提供了一种新型革兰氏阴性、兼性厌氧、多形性杆-状细菌, 所述新型细菌具有保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 1081, University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA, 具有下列保藏号的细菌的特征:

- 海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667 (内部命名为 BIV-4985);
- 海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 (内部命名为 BIV-AVICOR);
- 溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669 (内部命名为 BIV-07990)。

保藏日期为 2001 年 8 月 22 日。

30 因此, 本发明的一个最优选实施方案是保藏号为 ATCC No. PTA-3667 的

海藻巴斯德氏菌。这些细菌另外还例示于实施例1的表3中。

本发明的另一最优选实施方案是保藏号为 ATCC No. PTA-3668 的海藻巴斯德氏菌。这些细菌另外还例示于实施例1的表2中。

5 本发明的另一最优选实施方案是保藏号为 ATCC No. PTA-3669 的溶血性曼氏菌，这些细菌另外还例示于实施例1的表1中。

10 实施例中 A 部分和 B 部分的测试结果(表 1, 2 和 3) 确证了细菌 BIV-4895 ; ATCC No. PTA-3667 和 BIV-AVICOR; ATCC No. PTA-3668 属于巴斯德氏菌家族(海藻巴斯德氏菌，它们都是海藻糖阳性和阿拉伯糖阴性)，而细菌 BIV-07990 ; ATCC No. PTA-3669 属于曼氏菌科 (溶血性曼氏菌，它们是海藻糖阴性和阿拉伯糖阴性)。

15 本发明还涉及含有上述本发明细菌的微生物培养物。该培养物可以通过在 35-37°C 下培养所述细菌制得。该细菌可在正常大气氧压下生长。该细菌也可生长于本领域技术人员已知的多种不同的常用促进细菌生长的培养基，例如，胰蛋白胨肉汤(TB)、大豆 Trypticasein 肉汤或脑心灌注液肉汤或任一营养丰富培养基。还可 37°C 下绵羊血琼脂上孵育 24 小时培养该细菌。

各种物理及化学的细菌灭活方法已为本领域所知。物理灭活的实例为 UV-照射、X-射线照射、 γ -射线照射以及加热。灭活用化学药品的实例为 β -丙内酯、戊二醛、 β -乙烯亚胺及甲醛。

20 优选地本发明的细菌用甲醛灭活。令人惊奇的是，使用终浓度为 0.2% 的甲醛仍然是一种灭活本发明所述细菌的极好方法。

因此，另一方面，本发明涉及一种灭活本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的方法，其中包括使用终浓度 0.2% 的甲醛。

25 用上述方法以及本领域技术人员已知的其他灭活细菌方法灭活的本发明所述细菌具体体现在本发明中。因此，另一重要方面是用本发明方法或本领域已知方法可得到灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。优选地，本发明所述的灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

30 因此，另一重要方面是用本领域已知方法可获得的活的减毒海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。优选地，本发明所述的活的减毒海藻巴斯德氏菌和

/或溶血性曼氏菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667, 海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的减毒采用在合适培养基上多次传代或本领域已知的任一其他方法。

5 本申请中, 灭活意指本发明的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌被杀死而不能复制引发临床疾病。

本申请中, 减毒意指本发明的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌是活菌能够复制但不能导致临床疾病。

10 另一重要方面是用本领域已知方法可获得海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分或片段。所述片段可以通过用去污剂溶解本发明海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌或者其他任一本领域已知方法制得。

优选地, 所述组分或片段是本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的纯化抗原。优选地, 所述组分/片段是本发明海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的外膜蛋白。

15 本发明所述的“片段”是本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的任一免疫原性亚单位, 即任一多肽子集。

因此, 本发明涉及含本发明海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌至少一种抗原的片段。最优选地, 所述片段含有细菌的至少一种抗原, 该细菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667、海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。所述片段可包括所述菌株的整个细菌细胞、细菌提取物、外膜蛋白组分、细菌外-和/或内毒素以及纯化蛋白。其抗原性多肽或片段可例如获自纯化的细菌蛋白或者通过在一些原核或真核表达系统中表达相应遗传物质获得或者通过有机-化学(organo-chemical)合成获得。所述方法已为本领域技术人员已知。

25 本发明进一步涉及本发明所述活的、和/或活的减毒、和/或灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌组分在疫苗中的用途。

30 本发明进一步提供了一种源自上述新鉴定细菌的疫苗。因此, 本发明进一步还涉及一种疫苗组合物, 其中含有本发明所述活的、和/或活的减毒、和/或灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/

或溶血性曼氏菌组分。

本申请中的“疫苗”是指兽用疫苗，其中含有抗原物质，施用可诱导抗所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌导致疾病的特异性主动或被动免疫。本发明所述的活的或活的减毒海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌赋予主动免疫，可通过抗其所含免疫原的母源抗体被动转移，并且有时还能抗抗原性相关生物体。本发明所述的灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分赋予被动免疫。能够增强免疫应答的其他成分为通常称为佐剂的组分，例如，氢氧化铝、矿物油或其他油或者添加到疫苗的辅助分子或被所述附加成分相应诱导后机体产生的辅助分子，例如但不限于干扰素、白介素或生长因子。

在一个优选实施方案中，所述疫苗包含灭活细菌。优选地，本发明的疫苗是指上述疫苗，其中一种免疫活性成分是活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。术语“活疫苗”是指一种含有能分化/增殖的颗粒的疫苗。

还优选地，本发明的疫苗包含减毒后的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌以及一种药理学可接受的载体或赋形剂。所述疫苗还可以联合疫苗的方式施用，其中包含两株或多株活的、和/或活的且减毒后的和/或灭活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或两株或多株所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分。最优选地，疫苗中的活的、和/或活的且减毒后的和/或灭活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

还优选地，本发明的疫苗包含灭活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌以及药理学上可接受的载体或赋形剂。所述疫苗也可以联合疫苗的形式使用，其中含有两株或多株所述灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。

另外，也可用全细胞的组分作为本发明疫苗中的相关免疫原。因此，优选地，本发明的疫苗包含本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分以及一种药理学上可接受的载体或赋形剂。所述疫苗也可以联合疫苗的形式使用，其中含有两株或多株所述灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏

菌。具体而言，本发明涉及含有片段的疫苗，该片段包含本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的至少一种抗原。最优选地，本发明涉及一种含有片段的疫苗，该片段包含选自菌株的至少一种抗原，该菌株选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。所述片段可以包括全菌体细胞、细菌提取物、外膜成分、菌体外-和/或内毒素，以及纯化蛋白。其抗原多肽或片段可例如获自纯化的细菌蛋白或者通过在一些原核或真核表达系统中表达相应遗传物质获得或者通过有机-化学(organo-chemical)合成获得。所述方法已为本领域技术人员已知。

10 优选地，本发明的疫苗还包括一种佐剂。因此，本发明进一步涉及一种本发明所述疫苗组合物，该组合物中进一步包括一种或多种合适的佐剂和/或赋形剂和/或载体。

本申请中使用的佐剂包括能激发被注射动物免疫应答的物质。大量不同佐剂已为本领域已知。本申请中使用的佐剂包括氟氏完全(Freund's Complete) 15 佐剂及氟氏不完全佐剂、维生素 E、非-离子嵌段共聚物、胞壁酰二肽、Quil A、矿物及非矿物油、植物油以及 Carbopol (一种同聚物)。在一个优选实施方案中，本发明细菌的疫苗包含一种油包水乳剂佐剂。所述疫苗也可称为一种含灭活的(杀死的)本发明所述细菌以及一种油包水乳剂佐剂的菌苗。本发明中还详细公开了其他辅佐菌体的方法。

20 还优选地，本发明的疫苗可包含一种或多种合适乳化剂，例如 Span 或 Tween。

另外还优选地，疫苗中的所述活的、和/或活的且减毒后的和/或灭活的 25 本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。

优选地，本发明的疫苗含有至少一种细菌抗原，该细菌选自海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3667，海藻巴斯德氏菌 ATCC No. PTA-3668 和/或溶血性曼氏菌 ATCC No. PTA-3669。所述疫苗可包括所述菌株的全菌体细胞、细菌提取物、外膜蛋白组分、细菌外-和/或内毒素以及纯化蛋白。其抗原性多 30 肽或片段可例如获自纯化的细菌蛋白或者通过在一些原核或真核表达系统中

表达相应遗传物质获得或者通过有机-化学(organo-chemical)合成获得。所述方法已为本领域技术人员已知。

5 最优选地，本发明进一步涉及一种疫苗组合物，其中进一步含有至少一种其他的源自对禽类致病的病毒或微生物的抗原。优选地，所述抗原为活的、减毒的或灭活的病毒或微生物或其片段。所述片段可以包括全菌体细胞或病毒颗粒、细菌提取物、病毒抗原、病毒亚单位、外膜成分、细菌外-和/或内毒素以及纯化蛋白。其抗原性多肽或片段可例如获自纯化的细菌蛋白或者通过

10 最优选地，本发明进一步涉及一种疫苗组合物，其中含有至少一种其他的源自对禽类致病的病毒或微生物的抗原，其中所述的病毒或微生物选自，但不限于，传染性支气管炎病毒，新城疫病毒、传染性法氏囊病(Bursal)病毒(疾病: Gumboro)，鸡传染性贫血因子(Chicken Anaemia agent)、禽呼肠孤病毒(Avian Reovirus)、鸡败血枝原体(Mycoplasma gallisepticum)、禽肺病毒、副鸡嗜血杆菌 (疾病: 鼻炎)、鸡痘病毒(chicken poxvirus)、禽脑脊髓炎病毒(Avian Encephalomyelitis)、多杀性巴斯德氏杆菌以及大肠杆菌。

“药物组合物”基本上由一种或多种成分组成，该成分能修饰所给药机体的生物体或者存活于机体之内或之上生物体的生理功能，例如免疫原性。该术语包括，但不限于抗生素或抗寄生虫剂、以及其他用于实现其他特定目的的其他组分，例如但不限于，加工特性(processing traits)，灭菌，稳定，使得组合物可通过肠道或非胃肠道途径施用如经口、鼻内、静脉内、肌内、皮下、经皮或其他合适途径，施用后耐受、控制释放特性。因此，本发明另一重要方面，本发明涉及一种药物组合物，其中含有活的、和/或活的减毒的、和/或灭活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的组分。

25 本发明涉及一种对感染了海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌(例如，上述活细菌)的属于禽类的动物进行治疗的方法，其中将上述本发明的活的、减毒的、灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌以及/或者其组分和/或片段，按本领域技术人员已知的合适剂量施用给需要其的禽类，然后监测由所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌感染所引发症状的减轻情况。所述治疗

30

优选可重复进行。

另一个重要的实施方案是一种免疫禽类抗海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌 (例如, 上述活细菌)引发的呼吸及生殖道疾病的方法, 该方法包括施用免疫学有效量本发明所述疫苗, 然后监测由所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌感染所引发病状的减轻情况。

另一个重要实施方案是灭活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或存活的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或存活但减毒的本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌和/或者本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的片段或组分在制备用于预防海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌感染疫苗中的用途。

本发明还涉及一种诊断所致疾病的方法, 该方法包括: 从禽类获取样本, 其中所述样本选自全血、血清、血浆、组织刮取物、洗涤物、拭子、组织, 然后分析样本中本发明所述海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的存在情况。

在一个优选实施方案中, 海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的存在通过免疫试验测定。免疫试验使用海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌特异性单克隆抗体或多克隆抗血清。单克隆抗体的制备已为本领域已知(3, 4)。免疫试验包括本领域已知的检测方法, 例如 ELISA 试验(酶联免疫吸附测定)或所谓的夹心-ELISA 试验、斑点印迹、免疫印迹、放射免疫试验 (放射免疫测定 RIA), 二维双向扩散试验(diffusion-based Ouchterlony)或火箭免疫荧光测定, 或者凝集试验 (快速平板或微量滴定板凝集试验)。另一种免疫试验是所谓的 Western 印迹(又称 Western 转移法或 Western 转印)。Western 印迹的目的是将通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后的蛋白或多肽转移至硝酸纤维素滤膜或其他合适载体上, 与此同时保持各蛋白或多肽电泳后得到的相对位置。然后, 用试验中能特异性结合所述蛋白或抗体的抗体孵育上述 Western 印迹。这些检测方法可被本领域普通技术人员用来实施本申请所述的发明。本领域技术人员能够从下列参考文献中找到上述方法及其他检测方法: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock et al., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays : Laboratory

Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985).

在另一最具体实施方案中,用海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌特异性抗体孵育上述样本,然后测定生成的抗原/抗体复合物。

- 5 在本发明所述方法的一具体优选实施方案中,上述样本中海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的存在情况用分子生物学方法测定。本申请中使用的分子生物学方法是指检测方法,包括,例如,聚合酶链反应(PCR)、逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)或者可以是 Northern 或 Southern 印迹,本领域技术人员可在常见参考书中找到这些方法(例如 Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York and Bertram, S. and Gassen, H. G. Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991)。

本发明还包括诊断试剂盒,其特征为其中含有检测海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌所需的全部组件。

- 15 诊断试剂盒是实施本发明诊断方法所用全部成分的集合。实施本发明方法所用其他元件的一些实例(并非穷举)包括:容器例如 96-孔平板或微量滴定板、试管、其他合适容器,平面及支持物,膜例如硝酸纤维素滤膜,洗涤试剂及缓冲液。诊断试剂盒还可包括检测结合抗体的试剂,例如标记后的二抗、生色团、酶(例如,与抗体偶联)及其底物或其他能够结合抗体的底物。

- 20 本发明进一步还涉及一种诊断试剂盒,其特征为其中含有实施 PCR 或 RT-PCR 检测海藻巴斯德氏菌-和/或溶血性曼氏菌-特异性 DNA 或 RNA 所需的全部组件。所述试剂盒可包括,但不限于除试管或 96-孔平板或微量滴定板外的其他容器,平面及支持物,膜例如硝酸纤维素滤膜,洗涤试剂及反应缓冲液(其可以改变 pH 值及镁离子浓度),无菌水,矿物油,BSA (牛血清白蛋白), $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, DMSO (二甲亚砜), 巯基乙醇,核苷酸(dNTPs), 酶例如 Taq-聚合酶和逆转录酶,作为 DNA 基质的,海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌特异性 DNA 或 cDNA,海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌 DNA 或 RNA 的特异性寡核苷酸,对照模板,DEPC-水, DNA 酶, RNA 酶,以及其他本领域技术人员已知化合物。本发明所述的寡核苷酸是长度约 15-约 100
- 25 各核苷酸的短核酸分子,其在严谨条件下能与互补于海藻巴斯德氏菌和/或溶
- 30

血性曼氏菌蛋白的核酸序列结合。至于严谨条件，本领域技术人员是指同源性大于 85%，优选大于 90% 选择的条件（参见，Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York and Bertram, S. and Gassen, H. G. *Gentechnische Methoden*, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991).

附图说明

A) 自发作部位(field)

- 10 图 1) 肉鸡(Broilers): 鼻腔分泌物及眼周围水肿
 图 2) 肉鸡: 心脏及冠状脂肪出血。
 图 3) 肉鸡: 结膜炎及眼部周围炎症。
 图 4) 蛋鸡(Layers): 鼻腔分泌物以及鸡冠青紫下垂(displaced comb with cyanosis)。
 图 5) 蛋鸡: 眼睛周围炎症并出血。
 15 图 6) 蛋鸡: 耳道入口后皮肤组织出血。
 图 7) 蛋鸡: 肾脏炎症
 图 8) 蛋鸡: 输卵管出血。
 图 9) 蛋鸡 : 卵巢卵泡畸形。
 图 10) 蛋鸡: 前胃(proventriculus)和腺胃(gizzard)之间结合处出血。
 20 图 11) 蛋鸡: 输卵管充血和出血。
 B) 实验性感染
 图 12) 蛋鸡: 肾脏炎症并出血。
 图 13) SPF: 衰竭(俯卧)。
 图 14) 蛋鸡: 关节及肌肉出血。
 25 图 15) 蛋鸡: 鼻腔分泌物及苍白肉冠。
 图 16) 蛋鸡: 肌肉出血。
 图 17) SPF: 心脏及冠状动脉脂肪(coronary fat)出血。
 图 18) 蛋鸡: 左侧为健康鸡, 右侧为羽毛凌乱的病鸡。
 图 19) 蛋鸡: 绿色痢疾。
 30 图 20) SPF: 肌肉出血。

图 21) SPF: 衰竭(运动障碍)及绿色痢疾。

图 22) 蛋鸡: 肝肿大出血。

下列实施例是为了进一步阐释本发明, 绝不应理解为是对本发明范围的
5 限制。

实施例 1

与海藻巴斯德氏菌及溶血性曼氏菌相关的野外疾病暴发

临床症状

10 观察发作部位

蛋鸡	肉鸡
轻微的上呼吸道 / 生殖道	严重的上呼吸道 / 生殖道
日龄: 22 周龄	日龄: 7 周龄
鼻腔分泌物	喷嚏并伴有罗音
眼睛周围区域肿胀	头部肿胀
食物消耗量低	食物消耗量低
白色痢疾	精神萎靡
产蛋量降低	生长发育参差不齐
死亡率低	羽毛凌乱
鸡冠下垂	衰竭(prostration)
鸡冠青紫	死亡率 8 %

肉眼观察到的病变	
卵巢萎缩伴有出血和退行性变化	生殖腺出血
卵泡畸形	气管上部出血
肝脏增大	肝脏增大伴有出血
肾炎	肺泡炎
腹部脂肪出血	脾大伴有出血
胸腔出血	肌肉出血

输卵管出血	心脏出血及心包积液
冠状动脉脂肪出血	胸腔出血

三株新型革兰氏阴性、兼性厌氧、多形性杆-状细菌，保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 1081, University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA, 保藏号: BIV-4985 海藻巴斯德氏菌为 ATCC No. PTA-3667; BIV-AVICOR 海藻巴斯德氏菌为 ATCC No. PTA-3668 以及 BIV-07990 溶血性曼氏菌为 ATCC No. PTA-3669。保藏日为 2001 年 8 月 22 日。

按照常规测定方法对这些细菌分型，使用 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume I (1984. Williams and Wilkins, 428 East Preston Street. Baltimore, USA.)

10 表 1

溶血性曼氏菌: BIV-07990 (生物 1 型); ATCC No. PTA-3669

肉眼观察的形态

在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落，直径 1.0-1.5 mm，光亮半透明，微凸起、光滑、奶油状， β -溶血。

15

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性，不运动，多形性杆状，常呈现两极染色。

生化及其他试验

20 A 部分

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+
蔗糖	+
MacConkey	+

脲酶	-
硝酸盐	+

部分 B

麦芽糖	+
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖(cellobiose)	-
山梨醇	+
木糖(xilose)	+
海藻糖	-
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶灵(Esculine)	-
β 葡萄糖苷酶	-
α -岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

表 2 海藻巴斯德氏菌 BIV-AVICOR (生物 2 型); ATCC No. PTA-3668

肉眼观察的形态

- 5 在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落, 直径 1.0-1.5 mm, 光亮半透明, 微凸起、表面光滑、奶油状, β -溶血。

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性, 不运动, 多形性杆状, 常呈现两极染色。

生化及其他试验

10

A 部分

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+

蔗糖	+
MacConkey	+
脲酶	-
硝酸盐	+

部分 B

麦芽糖	+
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖	-
山梨醇	+
木糖	+
海藻糖	+
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶苷(Esculin)	-
β 葡萄糖苷酶	+ ^{α}
α -岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

^{α} 80% 是阳性

表 3 海藻巴斯德氏菌: BIV-4895 (生物 4 型); ATCC No. PTA-3667

5

肉眼观察的形态

在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落, 直径 1.0-1.5 mm, 光亮半透明, 微凸起、干燥微粒状, β -溶血。

10

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性, 不运动, 多形性杆状, 常呈现两极染色。

生化及其他试验

A 部分

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+
蔗糖	+
MacConkey	+
脲酶	-
硝酸盐	+

部分 B

麦芽糖	-
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖	-
山梨醇	+
木糖	+
海藻糖	+
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶苷	-
β 葡萄糖苷酶	-
α -岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

A 和 B 部分试验结果(表 1, 2 和 3)证实了细菌 BIV- 4895; ATCC No. 5 PTA-3667 和 BIV-AVICOR ; ATCC No. PTA-3668 属于巴斯德氏菌家族 (family)(海藻巴斯德氏菌, 海藻糖阳性及阿拉伯糖阴性), 而细菌 BIV-07990; ATCC No. PTA-3669 属于曼氏菌科(溶血性曼氏菌, 海藻糖阴性和阿拉伯糖阴

性)。

致病因子的鉴定

细菌分离自感染后的气管、腭裂、卵巢、肝、心、肾及生殖腺(肉鸡)。

5 根据下列试验它们被鉴定为海藻巴斯德氏菌和溶血性曼氏菌:

	β溶血	+
	革兰氏染色	-
	氧化酶	+
	过氧化氢酶	+
10	Mac Conkey	+
	脲酶	-
	硝酸盐	+
	吲哚	-

没有分离病毒或任一其他细菌。

15 生物分型: 纯化细菌分离株, 并按照 Jaworski et al.(1)所述方法进行生物分型。鉴定出三种不同生物型 (4, 2, 1)。

简而言之, 从纯化后的分离物中, 将单个菌落接种入装有 3 ml 胰蛋白胍肉汤的试管, 37°C 孵育 8 小时。然后从试管取一接种环接种物(20μl)转移入含 3 ml 1% 蔗糖的另一试管, 37°C 孵育 7 天然后记录结果。

20 攻击模型(challenge mode): 细菌纯化后, 将分离物培养于胰蛋白胍培养基获得大量纯化病原体。为了验证柯赫(koch)法则, 用每一生物型(0.2 ml/鸡; 3×10^8 CFU/ml) 通过静脉内途径感染三个不同组(每组 20 只鸡)的 13 周龄无特定病原体(SPF)鸡。每天观察鸡的发病率和死亡率, 共三天。在第三天时, 所有鸡全部宰杀, 记录尸检病变, 收集器官(肝和生殖腺)样本用于重分离。另
25 外还记录死鸡的尸检病变。

结果

临床症状: 俯卧(prostration), 跛行, 鸡冠下垂, 羽毛凌乱, 冠顶青紫(cyanosis)。

30 病变:

病变	BIV-4895 (生物 4 型)	BIV-Avicor (生物 2 型)	BIV-07990 (生物 1 型)
心脏水肿	73%	37%	90%
心脏出血	90%	-	70%
冠状动脉脂肪出血	90%	37%	50%
心包炎	73%	46%	30%
胸腔出血	-	19%	40%
卵巢出血	64%	9%	20%
肾炎	64%	46%	60%
肾出血	55%	46%	20%
肝脏增大伴有出血	-	73%	-
肺泡炎	64%	-	-
肌肉出血	-	37%	-
死亡率	46%	19%	-

实施例 II

本发明细菌的培养、疫苗制备及 SPF 鸡的接种。

将菌株培养于胰蛋白胨肉汤(TB)。依菌株而定接种后约 6-8 小时的对数生长期时收获。用滴定用的绵羊血琼脂进行平板计数。用收获产物的 1: 10 5 稀释液测定每毫升的菌落形成单位 (CFU/ml)。通过加入甲醛至终浓度为 0.2% 杀死细胞。无菌检验该悬浮液后, 将最小滴定量量的 10^8 CFU/ml 加入到疫苗终产物中。

10 通过把两菌株(BIV-4895, ATCC No. PTA-3667 和 BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668)和油佐剂(用矿物油按 60% 油/40% 水的比例的油包水乳液)混合至最小浓度 $10^{7.0}$ CFU/菌株/ml, 制备疫苗。

无特定病原体(SPF)鸡在 2.5 和 9 周龄时, 以在颈部下半部皮下注射 0.5ml 疫苗的方式接种。

实施例III

攻击菌株的制备以及接种和对照组的攻击。

- 5 将菌株 BIV-4895、ATCC No. PTA-3667 和 BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668 在绵羊血琼脂上 37°C 培养 24 小时。用胰蛋白胨肉汤(TB)收获细胞直至获得用波长 540nm 分光光度计测得的光密度为 2.0 的悬液。为了实施攻击, 制备最终攻击-体积中含有下列数目细胞的制剂:

3×10^9 CFU/ml BIV-AVICOR ; ATCC No. PTA-3668

1.45×10^{10} CFU/ml BIV-4895 ; ATCC No. PTA-3667

- 10 在 13 周龄时, 20 只接种后的和 20 只未-接种的鸡通过静脉途径 0.2 ml 接种物 (至少 10^8 CFU/鸡) 攻击。观察三天内鸡的发病率和死亡率。观察 3 天后, 将剩下的鸡全部宰杀, 从每只鸡的肝和生殖腺中重-分离细菌。将死鸡的尸检病变也记录了下来。

结果

鸡的分组	攻击接种	死亡率+重分离	保护 %
阴性对照	N/A	0	N/A
阳性对照	ATCC No. PTA-3667	77	23
阳性对照	ATCC No. PTA-3668	54	46
接种	ATCC No. PTA-3667	0	100
接种	ATCC No. PTA-3668	5	95

- 15 实施例 IV

本发明细菌的培养、疫苗制备及 SPF 鸡的接种。

- 20 将菌株培养于胰蛋白胨肉汤(TB)。依菌株而定接种后约 6-8 小时的对数生长期时收获。用滴定用的绵羊血琼脂进行平板计数。用收获产物的 1: 10 稀释液测定每毫升的菌落形成单位 (CFU/ml)。通过加入甲醛至终浓度为 0.2% 杀死细胞。无菌检验该悬浮液后, 将最小滴定量的 10^8 CFU/ml 加入到疫苗终产物中。

通过把三个菌株(BIV-4895, ATCC No. PTA-3667 和 BIV-AVICOR, ATCC No. PTA-3668 和 BIV-07990, ATCC No. PTA-3669)和油佐剂(用矿物油按 60

%油 40%水的比例的油包水乳液)混合至最小浓度 $10^{7.0}$ CFU/菌株/ml, 制备疫苗。

无特定病原体(SPF)鸡在 2、5 和 9 周龄时, 以在颈部下半部皮下注射 0.5ml 疫苗的方式接种。

5

实施例 V

攻击菌株的制备以及接种和对照组的攻击。

将菌株 BIV-4895、ATCC No. PTA-3667, BIV-AVICOR、ATCC No. PTA-3668 和 BIV-07990, ATCC No. PTA-3669 在绵羊血琼脂上 37°C 培养 24 小时。用胰蛋白胨肉汤(TB)收获细胞直至获得用波长 540nm 分光光度计测得的光密度为 2.0 的悬液。为了实施攻击, 制备最终攻击-体积中含有下列数目细胞的制剂:

8.3×10^9 CFU/ml BIV-AVICOR ; ATCC No. PTA-3668

2.2×10^9 CFU/ml BIV-4895 ; ATCC No. PTA-3667

15

1.0×10^{10} CFU/ml BIV-07990 ; ATCC No. PTA-3669

在 13 周龄时, 20 只接种后的和 20 只未-接种的鸡通过静脉途径 0.2 ml 接种物 (至少 $10^{8.0}$ CFU/鸡) 攻击。观察三天内鸡的发病率和死亡率。观察 3 天后, 将剩下的鸡全部宰杀, 从每只鸡的肝和生殖腺中重-分离细菌。将死鸡的尸检病变也记录了下来。

20

结果

鸡的分组	攻击接种	死亡率+重分离	保护 %
接种阴性对照	N/A	0	N/A
未接种阴性对照	N/A	0	N/A
接种	ATCC No.PTA-3669	27.3	72.7
接种	ATCC No.PTA-3668	20.9	79.1
接种	ATCC No. PTA-3667	16.7	83.7
阳性对照	ATCC No.PTA-3669	53.3	46.7
阳性对照	ATCC No.PTA-3668	53.3	46.7
阳性对照	ATCC No. PTA-3667	64.3	35.7

血清学试验

按照 Biberstein et.al.(2)中的方法，用兔子制备代表各生物型的分离株的高免血清。

5 分离株用血琼脂培养基过夜培养，然后收获于含 0.3% 的福尔马林的盐水中。细胞洗涤一次，调节至 575nm 处透光度为 10% 用于注射。按照下列方案静脉内(IV)注射：

0.5ml、1.0、2.0、3.0、3.0、3.0，时间间隔为 4 天，最后一次注射后 4 天对所有兔子放血。

10 用 3 个生物型毒株测试高免血清的特异性，并通过快速平板凝集与同源及异源抗血清(2 倍稀释)反应。

对每一生物型的抗血清进行稀释直至能测得阳性结果的最大稀释程度为止。

稀释(\log^2)

抗原生物型 1

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

15

稀释(\log^2)

抗原生物型 4

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

稀释(\log^2)

抗原生物型 2

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

3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

然后用生物型特异性高免血清作为微量-滴定板血清凝集试验的阳性对照。

实施例VI

5 攻击菌株的制备以及接种和对照组的攻击。

将菌株 BIV-4895、ATCC No. PTA-3667, BIV-AVICOR、ATCC No. PTA-3668 和 BIV-07990, ATCC No. PTA-3669 在绵羊血琼脂上 37°C 培养 24 小时。用胰蛋白胨肉汤(TB)收获细胞直至获得用波长 540nm 分光光度计测得的光密度为 2.0 的悬液。为了实施攻击, 制备最终攻击-体积中含有下列数目细胞的

10 制剂:

1.5×10^{10} CFU/ml BIV-AVICOR ; ATCC No. PTA-3668

1.7×10^{10} CFU/ml BIV-4895 ; ATCC No. PTA-3667

1.6×10^{10} CFU/ml BIV-07990 ; ATCC No. PTA-3669

15 在 13 周龄时, 20 只接种后的和 20 只未-接种的鸡通过静脉途径 0.2 ml 接种物 (至少 $10^{8.0}$ CFU/鸡) 攻击。观察三天内鸡的发病率和死亡率。观察 3 天后, 将剩下的鸡全部宰杀, 记录死后损伤并从每只鸡的肝、心和生殖腺中重-分离细菌。

结果

20 表 1. 根据死亡率和重-分离情况评估疫苗的效用

鸡的分组	攻击接种	死亡率+ 重分离	保护 %
未接种阴性对照	N/A	N/A	N/A
阳性对照	BIV-4895	70	30
阳性对照	BIV-AVICOR	80	20
阳性对照	BIV-07990	88.8	11.2
接种	BIV-4895	10	90
接种	BIV-AVICOR	10	90
接种	BIV-07990	15	85

表 2. 根据攻击后肉眼观察病变评估疫苗的效用

鸡的分组	攻击接种物	病变 %	保护 %
未接种的阴性对照	N/A	N/A	N/A
阳性对照	BIV-4895	74.4	25.6
阳性对照	BIV-AVICOR	27.0	73.0
阳性对照	BIV-07990	7.0	93.0
接种	BIV-4895	4.0	96.0
接种	BIV-AVICOR	1.1	99.0
接种	BIV-07990	2.4	98.0

参考文献

- 5 1) Jaworski M.D., D. L. Hunter, A. C. S. Ward. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J. Vet. Invest. 1988, 10: 49-55.
- 2) Biberstein EL. , Meyer M.E. , and Kenedy P.C. Colonial variation of *Pasteurella haemolytica* isolated from sheep. J. Bact. 1958, 76: 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. 1979, 123: 1548-1550.
- 10 4) Köhler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975, 265: 495-497.

PCT 原始文件(用于提交)---2002年10月23日 09:05:55 印制 1-1265-PCT

0-1	PCT/RO/134 表 (PCT.EASY 格式) 对保藏的微生物或其它生物材料的说明 (PCT 细则 13 之二)	PCT-EASY 版本 2.92 (2002 年 1 月 10 日更新)
0-1-1	备用	
0-2	国际申请号	PCT-EP02/11899
0-3	申请人或代理人档案号	1-1265-PCT

1	以下说明是针对在说明书被提及材料保藏的微生物或其它生物材料:	
1-1	页数	15
1-2	行数	4
1-3	保藏证明	美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 10801, University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 美国 2001 年 8 月 22 日(22.08.2001) ATCC PTA-3667
1-3-1	保藏机构	
1-3-2	保藏机构的地址	
1-3-3	保藏日期	
1-3-4	保藏编号	ATCC PTA-3667
1-4	补充说明	BIV-4895 Avian Pasteurella trehalosi
1-5	本说明所针对的指定国	所有指定国
1-6	分别提供的说明	没有
	本说明将于后些时候提交到国际局	

2	以下说明是针对在说明书被提及保藏的微生物或其它生物材料:	
2-1	页数	14
2-2	行数	3
2-3	保藏证明	美国典型培养物保藏中心
2-3-1	保藏机构	

2-3-2	保藏机构的地址	(American Type Culture Collection) 10801, University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 美国
2-3-3	保藏日期	2001年8月22日(22.08.2001)
2-3-4	保藏编号	ATCC PTA-3668
2-4	补充说明	BIV-AVICOR Avian Pasteurella trehalosi
2-5	本说明所针对的指定国	所有指定国
2-6	分别提供的说明 本说明将于后些时候提交到国际局	没有
3	以下说明是针对在说明书被提及保藏的微生物或其它生物材料:	
3-1	页数	13
3-2	行数	11
3-3	保藏证明	
3-3-1	保藏机构	美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)
3-3-2	保藏机构的地址	10801, University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 美国
3-3-3	保藏日期	2001年8月22日(22.08.2001)
3-3-4	保藏编号	ATCC PTA-3669
3-4	补充说明	BIV-07990 Avian Mannheimia haemolytica
3-5	本说明所针对的指定国	所有指定国
3-6	分别提供的说明 本说明将于后些时候提交到国际局	没有

由受理局填写

0-4	本表格已经和国际申请一起收到 (是或否)	是
0-4-1	受理官员	Y. Marinus-v.d.Nouweland

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期	
0-5-1	受理官员	

美国典型培养物保藏中心
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110-2209
电话: 703-365-2700
传真: 703-365-2745

5

此为传真件

日期: 2001年9月12日

收件人: Abelardo Aquilar

10 收件人传真号码: 52 3 668 80 80

发件人: ATCC 专利保藏处

传真页数: 1 (包括此首页)

题由: 专利保藏

Avian Pasteurella trehalosi: BIV-4895 被给予 ATCC 保藏号: PTA-3667;

Avian Pasteurella trehalosi: BIV-AVICOR 被给予 ATCC 保藏号:

15 PTA-3668;

Avian Mannheimia haemolytica: BIV-07990 被给予 ATCC 保藏号:

PTA-3669。

保藏日期: 2001年8月22日。纸件将于几天后转达给您。关于收费的收据将分别寄出:

20	标准保藏/通知	\$ 3450.00
	存活实验	480.00

	PTA-3667 至 PTA-3669 的总价款	\$ 3930.00
--	--------------------------	------------

25 Marie Harris, 专利专家
ATCC 专利保藏处

请注意: 从 2001 年 1 月 1 日起关于专利保藏的收费价格上涨。保藏表格也于 2000 年 2 月进行了更改。有关目前使用的保藏表格和收费说明的信息

30 可以从我们的网站获得: www.atcc.org

生物保藏布达佩斯条约**美国典型培养物保藏中心**

10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209

电话: 703-365-2700; 传真: 703-365-2745; email:

applied-sci@atcc.org

ATCC

- 5 本表格用于专利目的的保藏或对保藏类型的转换,以使之满足布达佩斯条约关于微生物保藏的国际认可的要求

所有问题必须有英文作答。一张表格只能填写一种菌株。

1. 保藏物名称。如果是保藏物是微生物,请给出其科学命名法的全称,包括属名,种名和该材料的分离来源;如果保藏物是病毒,请给出其命名,并明确是来源于植物还是动物,其来源地,包括其地理位置;如果保藏物是细胞系,请给出其组织和种名,分离来源的地理位置,以及任何与其相关的危害(HIV, EBV, 等);如果保藏物是基因材料,请给出衍生其的载体,克隆或文库的生物名称,请给出由物种(例如,人,鼠)鉴定的 DNA 插入的来源或其科学命名,基因的名称,以及对宿主生物的同源性;如果保藏是聚生体(consortia)或混合培养的,请明确每一种成分;如果保藏物是种子,胚胎,虫卵等,请给出俗名,科学名以及地理来源。
- 10
- 15

Avian Mannheimia haemolytica (以前被称为 Pasteurella haemolytica)

2. 菌株命名(即,数字,符号等)(该菌株命名必须与其贮藏瓶上的标签一致)
- 20

BIV-07990

3. 这是布达佩斯条约下的首次保藏吗? 是

4. 这是否是将 ATCC 的已有保藏转为满足布达佩斯条约要求的保藏? 如果是请给出 ATCC 命名。

- 25 不适用于该情况。

5. 该保藏物是微生物或细胞的混合物吗? 不是

6. 请提供关于对该保藏物的培养,存活检测及储存保藏物的详细条件。如果是混合物,请对各个成分给予说明并提供鉴别其存在的方法。如果是质粒,请提供其宿主名称以及抗生素抗性。

- 30 见附件 3

被告知人 _____

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038 E-mail:

baguilar@gua.boehringer-ingelheim.com

5 11. 除非事先对付帐事宜有约定, 使用支票或信用卡 (Mastercard, VISA 或 American Express) 时必须出示保藏。ATCC 也接受正确帐户中的订单。

订单号 _____ 支票号 _____

信用卡号 (请注明是 Master 卡, VISA 卡还是 AE 卡) _____

到期日 _____ 卡上名字 (请清晰书写或打印) _____ 持卡人签名 _____

10 支付: ATCC 必须要有一个寄帐单的地址, 请注明负责所有保藏物的联系人, 电话和传真号码。

联系人: Abelardo Aguilar

Calle 30 No. 2614 Zonal Industrial 44940

Guadalajara, Jalisco, Mexico

15 传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038

12. 您的律师的姓名, 地址, 电话和传真号码 _____

13. 必填项

此保藏是在 Boehringer Ingelheim Vetmedica, S. A. de C.V. 的名义下。

20 我明白并且同意此保藏物在布达佩斯条约规定的一段时间 (自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日内 5 年内, 取上述两者中长者,) 能被我撤消。如果在相应的专利期限或规定的一段时间内保藏物死亡或被毁坏, 提供相同生物的活的培养或病毒情况下为, 细胞培养物, 质粒, 胚胎和种子将是我的责任。在规定的时间内提供足够量的保藏物也将是我的责任。

25

Ing. Jorge Suchil B.

2001 年 5 月 24 日

打印的

签名

日期

地址 Calle 30 No. 2614 Zona Industrial 44940 Guadalajara, Jalisco, Mexico

30 传 真 : 523 668 80 80 电 话 : 523 668 8038 E-mail:

jsuchil@gua.boehringer-ingenelheim.com

保藏物和表格需要寄给如下地址:

5,

Patent Depository
American Type Culture Collection
 10801 University Blvd. Manassas, VA
 20110-2209, USA

保藏: 正如大多数国家的专利局所要求的, 保藏日期是自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日内 5 年内, 取上述两者中长者。

10 收费: 请登陆我们的网站 www.atcc.org, 或是通过电邮 applied-sci@atcc.org, 或是打电话至 703-365-2700 来索取我们的收费单, 收费价格可能浮动。

由 ATCC 填写

15 ATCC 指定国 _____ 是否收到 _____ 存活实验结果 _____
 保藏物名称 _____ 菌株指定国 _____

对此表格的不正确填写将会延误申请

请打印或清楚书写

<p>只有在填写了此表格并且其中的信息被证实了之后(9CFR 94, 95 和 122), 此申请中的受监控的物质, 生物或载体才能进入美国或在各州之间流动</p> <p>根据 1995 年的 Paperwork Reduction 法案, 当用于收集信息的表格上没有显示有效 OMB 控制号码时, 任何人可以拒绝填写该表格。此信息表格的 OMB 控制号码为 0579-0015。针对每一表格上的信息, 本机构的工作时间大约为 1.6-3 小时, 包括阅读说明, 搜索现有的数据库, 收集并维持所需的数据, 以及完成和阅读所收集到的信息。</p>		<p>此表格的 OMB 许可号 0579-0015</p>
<p>美国农业部 动植物健康检查服务中心 兽医服务中心 国家进出口中心, 产品项目 4700 River Road, Unit 40 Riverdale, MO 20737-1231 应用于: 进口和运输受监控材料或生物体或载体</p>	<p>1. 运输方式 <input type="checkbox"/> 空运 <input type="checkbox"/> 海运 <input type="checkbox"/> 陆运 <input type="checkbox"/> 其他</p>	
	<p>2. 进入的美国海关</p>	
<p>3. 进口者: 美国典型培养物保藏中心 10801, University Bvd. Manassas VA 20110-2209 电话: (703)365-2700, 传真: 365-2745</p>	<p>4. 发货人</p>	
<p>5. 对入关物品的描述 (请尽可能地提供下列信息: 动物种类, 动物产品源的组织, 此动物的原动物产品起源国家, 对此动物的处理国家, 重组系统, 基因插入片段, 抗体免疫原, 稳定剂, 动物源在培养基中的营养因子)</p> <p>25 个玻璃瓶, 其中装有冻干的 Avian Manheimia haemolytica 以前被称为 Pasteurella haemolytica, 被鉴定为 BIV-07990</p>		
<p>6. 进口的数量, 次数, 以及预期的结束日期</p>		
<p>7. 该进口物品的预期使用目的 (对于动物病原体或载体, 请描述其实验室/生物安全过程)</p>		
<p>8. 如果是被用于动物, 请说明具体动物物种</p>		
<p>9. 在该物品被进口至美国之前对其进行的处理 (对其的处理纯化方法, 包括处理时间, 温度, pH 值, 其它处理, 疾病安全等级等)</p> <p>请见附件 6</p>		
<p>10. 对该进口材料或衍生物的最后处理方法</p>		
<p>由我所代表的公司/机构的授权, 我证明此物品的使用将遵守所有限定和规定</p>		
<p>11. 申请人签字</p>	<p>12. 打印清楚的名字和头衔</p>	
<p>13. 日期</p>	<p>14. 付款方式 (请注明信用卡类型及到期日)</p>	

VS 表格 16-3 (99 年 11 月)

附件 3

布达佩斯条约保藏

对问题 6 的回答

培养特性 该菌株能够生长于心脑浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion broth) (Difco)或胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptose Soy broth)。37℃下孵育约 6-8 小时达到对数生长期。

在血琼脂平板中, 生长峰值出现于 37℃孵育 24 小时后, 这种方法的优点是能够观察到溶血现象。

10 冻干保存. 细菌在心脑浸出液肉汤(Difco)中生长 6-8 小时. 用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液, 按 1:1 (v/v)比例作为稳定剂。

存活力试验. 取一小瓶冻干物, 用 1ml 无菌 PBS 1X, pH 7.2 重配。用无菌 PBS, pH 7.2 作 10 倍系列稀释。每一稀释度各取 100 μ l 接种于血琼脂平板。37℃孵育 24 小时。用菌落计数方法检验存活力。

15

对问题 7 的回答

7.3. BIV-0799

肉眼观察的形态

20 在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落, 直径 1.0-1.5 mm, 光亮半透明, 微凸起、表面光滑、奶油状, β -溶血。

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性, 不运动, 多形性杆状, 常呈现两极染色。

25

生化及其他试验

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+
蔗糖	+
MacConkey	+
脲酶	-
硝酸盐	+

麦芽糖	+
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖	-
山梨醇	+
xilose	+
海藻糖	-
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶苷	-
β 葡萄糖苷酶	-
α - 岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

附件 6

进入许可

对问题 6 的回答 (进入美国前材料的处理)

- 5 BIV-07990 菌株
1. 从产蛋鸡输卵管中分离
 2. 器官浸软(Maceration)
 3. 接种于营养肉汤(20 ml 购自 Difco 的 BHI)
 4. 37°C 孵育 24 小时
- 10 5. 接种于绵羊血琼脂平板
6. 分离 β 溶血菌落
 7. 接种于绵羊血琼脂平板
 8. 鉴定(生化及其他试验)
 9. 接种于购自 Difco 的 BHI
- 15 10. 细菌在 心脑浸出液肉汤(Difco)中培养 6-8 小时
11. 用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液,按 1:1 (v/v)比例作为稳定剂。
 12. 样本冻干
 13. 生存力、纯度及生化试验

20

生物保藏布达佩斯条约**美国典型培养物保藏中心**

10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209

电话: 703-365-2700; 传真: 703-365-2745; email:

applied-sci@atcc.org

ATCC

- 5 本表格用于专利目的的保藏或对保藏类型的转换,以使之满足布达佩斯条约关于微生物保藏的国际认可的要求

所有问题必须有英文作答。一张表格只能填写一种菌株。

1. 保藏物名称。如果是保藏物是微生物,请给出其科学命名法的全称,包括属名,种名和该物质的分离来源;如果保藏物是病毒,请给出其命名,并明确是来源于植物还是动物,其来源地,包括其地理位置;如果保藏物是细胞系,请给出其组织和种名,分离来源的地理位置,以及任何与其相关的危害(HIV, EBV, 等);如果保藏物是基因材料,请给出衍生其的载体,克隆或文库的生物名称,请给出由物种(例如,人,鼠)鉴定的 DNA 插入的来源或其科学命名,基因的名称,以及对宿主生物的同源性;如果保藏是聚生体(consortia)或混合培养的,请明确每一种成分;如果保藏物是种子,胚胎,虫卵等,请给出俗名,科学名以及地理来源。

Avian Pasteurella (以前被称为 Pasteurella haemolytica)

- 20 2. 菌株命名(即,数字,符号等)(该菌株命名必须与其贮藏瓶上的标签一致)

BIV-AVICOR

3. 这是布达佩斯条约下的首次保藏吗? 是

4. 这是否是将 ATCC 的已有保藏转为满足布达佩斯条约要求的保藏?

- 25 如果是请给出 ATCC 命名。

不适用于该情况。

5. 该保藏物是微生物或细胞的混合物吗? 不是

6. 请提供关于对该保藏物的培养,存活检测及储存保藏物的详细条件。

如果是混合物,请对各个成分给予说明并提供鉴别其存在的方法。如果是质

- 30 粒,请提供其宿主名称以及抗生素抗性。

在相应的美国专利被授权并且 ATCC 被通知后, 根据美国专利局条约和细则 (37CFR 1.808 [a][2]), 任何人向 ATCC 请求得到该保藏物都将被允许。

10. 在存活实验完全之后 ATCC 将告知您该保藏物的 ATCC 保藏号。

被告知人 Abelardo Aguilar

5 传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038 E-mail: baguilar@gua.boehringer-ingenheim.com

11. 除非事先对付帐事宜有约定, 使用支票或信用卡 (Mastercard, VISA 或 American Express) 时必须出示保藏。ATCC 也接受正确帐户中的订单。

订单号 _____ 支票号 _____

10 信用卡号 (请注明是 Master 卡, VISA 卡还是 AE 卡) _____

到期日 _____ 卡上名字 (请清晰书写或打印) _____ 持卡人签名 _____

支付: ATCC 必须要有一个寄帐单的地址, 请注明负责所有保藏物的联系人, 电话和传真号码。

15 联系人: Abelardo Aguilar

Calle 30 No. 2614 Zonal Industrial 44940

Guadalajara, Jalisco, Mexico

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038

12. 您的律师的姓名, 地址, 电话和传真号码 _____

20 13. 必填项

此保藏是在 Boehringer Ingelheim Vetmedica, S. A. de C.V. 的名义下。

25 我明白并且同意此保藏物在布达佩斯条约规定的一段时间 (自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日内 5 年内, 取上述两者中长者,) 能被我撤消。如果在相应的专利期限或规定的一段时间内保藏物死亡或被毁坏, 提供相同生物的活的培养或病毒情况下为, 细胞培养物, 质粒, 胚胎和种子将是我的责任。在规定的一段时间内提供足够量的保藏物也将是我的责任。

Ing. Jorge Suchil B. 2001 年 5 月 24 日

30

打印的签名

签名

日期

地址 Calle 30 No. 2614 Zona Industrial 44940 Guadalajara, Jalisco,
Mexico

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038 E-mail:
jsuchil@gua.boehringer-ingenelheim.com

- 5 保藏物和表格需要寄给如下地址: **Patent Depository**
American Type Culture Collection
 10801 University Blvd. Manassas, VA
 20110-2209, USA

保藏: 正如大多数国家的专利局所要求的, 保藏日期是自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日起 5 年内, 取上述两者中长者。

- 10 收费: 请登陆我们的网站 www.atcc.org, 或是通过电邮 applied-sci@atcc.org, 或是打电话至 703-365-2700 来索取我们的收费单, 收费价格可能浮动。

由 ATCC 填写

ATCC 指定国 _____ 是否收到 _____ 存活实验结果 _____

- 15 保藏物名称 _____ 菌株指定国 _____

对此表格的不正确填写将会延误申请

请打印或清楚书写

<p>只有在填写了此表格并且其中的信息被证实了之后(9CFR 94, 95 和 122),此申请中的受监控的物质, 生物或载体才能进入美国或在各州之间流动</p>		<p>根据 1995 年的 Paperwork Reduction 法案, 当用于收集信息的表格上没有显示有效 OMB 控制号码时, 任何人可以拒绝填写该表格。此信息表格的 OMB 控制号码为 0579-0015。针对每一表格上的信息, 本机构的工作时间大约为 1.6-3 小时, 包括阅读说明, 搜索现有的数据库, 收集并维持所需的数据, 以及完成和阅读所收集到的信息。</p>		<p>此表格的 OMB 许可号 0579-0015</p>
<p>美国农业部 动植物健康检查服务中心 兽医服务中心 国家进出口中心, 产品项目 4700 River Road, Unit 40 Riverdale, MO 20737-1231 应用于: 进口和运输受监控材料或生物体或载体</p>		<p>1. 运输方式 <input type="checkbox"/> 空运 <input type="checkbox"/> 海运 <input type="checkbox"/> 陆运 <input type="checkbox"/> 其他</p>		
<p>3. 进口者: 美国典型培养物保藏中心 10801, University Blvd. Manassas VA 20110-2209 电话: (703)365-2700, 传真: 365-2745</p>		<p>2. 进入的美国海关</p> <p>4. 发货人</p>		
<p>5. 对入关物品的描述 (请尽可能地提供下列信息: 动物种类, 动物产品源的组织, 此动物的原动物产品起源国家, 对此动物的处理国家, 重组系统, 基因插入片段, 抗体免疫原, 稳定剂, 动物源在培养基中的营养因子)</p> <p>25 个玻璃瓶, 其中装有冻干的 Avian Pasteurella trehalosi 以前被称为 Pasteurella haemolytica, 被鉴定为 BIV-AVICOR</p>				
<p>6. 进口的数量, 次数, 以及预期的结束日期</p>				
<p>7. 该进口物品的预期使用目的 (对于动物病原体或载体, 请描述其实验室/生物安全过程)</p>				
<p>8. 如果是被用于动物, 请说明具体动物物种</p>				
<p>9. 在该物品被进口至美国之前对其进行的处理 (对其的处理纯化方法, 包括处理时间, 温度, pH 值, 其它处理, 疾病安全等级等)</p> <p>请见附件 5</p>				
<p>10. 对该进口材料或衍生物的最后处理方法</p>				
<p>由我所代表的公司/机构的授权, 我证明此物品的使用将遵守所有限定和规定</p>				
<p>11. 申请人签字</p>		<p>12. 打印清楚的名字和头衔</p>		
<p>13. 日期</p>		<p>14. 付款方式 (请注明信用卡类型及到期日)</p>		

VS 表格 16-3 (99 年 11 月)

附件 2

布达佩斯条约保藏

对问题 6 的回答

培养特性 该菌株能够生长于心脑浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion broth) (Difco)或胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptose Soy broth)。37℃下孵育约 6-8 小时达到对数生长期。

在血琼脂平板中, 于 37℃孵育 24 小时后出现生长峰值, 这种方法的优点是能够观察到溶血现象。

10 冻干保存. 细菌在心脑浸出液肉汤(Difco)中生长 6-8 小时. 用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液, 按 1:1 (v/v)比例作为稳定剂。

存活力试验. 取一小瓶冻干物, 用 1ml 无菌 PBS 1X, pH 7.2 重配. 用无菌 PBS, pH 7.2 作 10 倍系列稀释. 每一稀释度各取 100 μ l 接种于血琼脂平板. 37℃孵育 24 小时. 用菌落计数方法检验存活力。

15

对问题 7 的回答。

7.2. BIV-AVICOR

肉眼观察的形态

20 在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落, 直径 1.0-1.5 mm, 光亮半透明, 微凸起、表面光滑、奶油状, β -溶血。

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性, 不运动, 多形性杆状, 常呈现两极染色。

25 生化及其他试验

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+
蔗糖	+
MacConkey	+
脲酶	-
硝酸盐	+

麦芽糖	+
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖	-
山梨醇	+
xilose	+
海藻糖	+
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶苷	-
β 葡萄糖苷酶	+ ^a
α - 岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

^a 80% 是阳性

附件 5**进入许可**

对问题 6 的回答 (进入美国前材料的处理)

BIV-AVICOR 菌株

- 5 1. 从产蛋母鸡心脏中分离
2. 器官浸软
3. 接种于营养肉汤(20 ml 购自 Difco 的 BHI)
4. 37°C 孵育 24 小时
5. 接种于绵羊血琼脂平板
- 10 6. 分离 β 溶血菌落
7. 接种于绵羊血琼脂平板
8. 鉴定(生化及其他试验)
9. 接种于购自 Difco 的 BHI
10. 细菌在心脑浸出液肉汤(Difco)中培养 6-8 小时
- 15 11. 用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液, 按 1 : 1 (v/v)比例作为稳定剂
12. 样本冻干
13. 生存力(viability)、纯度及生化试验

生物保藏布达佩斯条约

美国典型培养物保藏中心

10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209

电话：703-365-2700；传真：703-365-2745；email:

applied-sci@atcc.org

ATCC

5

本表格用于专利目的的保藏或对保藏类型的转换，以使之满足布达佩斯条约关于微生物保藏的国际认可的要求

所有问题必须有英文作答。一张表格只能填写一种菌株。

1. 保藏物名称。如果是保藏物是微生物，请给出其科学命名法的全称，
10 包括属名，种名和该物质的分离来源；如果保藏物是病毒，请给出其命名，
并明确是来源于植物还是动物，其来源地，包括其地理位置；如果保藏物是
细胞系，请给出其组织和种名，分离来源的地理位置，以及任何与其相关的
危害（HIV，EBV，等）；如果保藏物是基因材料，请给出衍生其的载体，
15 克隆或文库的生物名称，请给出由物种（例如，人，鼠）鉴定的 DNA 插入
的来源或其科学命名，基因的名称，以及对宿主生物的同源性；如果保藏是
聚生体(consortia)或混合培养的，请明确每一种成分；如果保藏物是种子，胚
胎，虫卵等，请给出俗名，科学名以及地理来源。

Avian Pasteurella trehalosi (以前被称为 Pasteurella haemolytica)

- 20 2. 菌株命名（即，数字，符号等）（该菌株命名必须与其贮藏瓶上的标
签一致）

BIV-4895

3. 这是布达佩斯条约下的首次保藏吗？ 是
4. 这是否是将 ATCC 的已有保藏转为满足布达佩斯条约要求的保藏？
25 如果是请给出 ATCC 命名。

不适用于该情况。

5. 该保藏物是微生物或细胞的混合物吗？ 不是
6. 请提供关于对该保藏物的培养，存活检测及储存保藏物的详细条件。
如果是混合物，请对各个成分给予说明并提供鉴别其存在的方法。如果是质
30 粒，请提供其宿主名称以及抗生素抗性。

10. 在存活实验完全之后 ATCC 将告知您该保藏物的 ATCC 保藏号。

被告知人 Abelardo Aguilar

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038 E-mail:

baguilar@gua.boehringer-ingenelheim.com

5 11. 除非事先对付帐事宜有约定, 使用支票或信用卡 (Mastercard, VISA 或 American Express) 时必须出示保藏。ATCC 也接受正确帐户中的订单。

订单号 _____ 支票号 _____

信用卡号 (请注明是 Master 卡, VISA 卡还是 AE 卡) _____

到期日 _____ 卡上名字 (请清晰

10 书写或打印) _____

持卡人签名 _____

支付: ATCC 必须要有一个寄帐单的地址, 请注明负责所有保藏物的联系人, 电话和传真号码。

联系人: Abelardo Aguilar

15 Calle 30 No. 2614 Zonal Industrial 44940

Guadalajara, Jalisco, Mexico

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038

12. 您的律师的姓名, 地址, 电话和传真号码 _____

13. 必填项

20 此保藏是在 Boehringer Ingelheim Vetmedica, S. A. de C.V. 的名义下。

我明白并且同意此保藏物在布达佩斯条约规定的一段时间 (自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日内 5 年内, 取上述两者中长者,) 能被我撤消。如果在相应的专利期限或规定的一段时间内保藏物死亡或被毁坏, 提供相同生物的活的培养或病毒情况下为, 细胞培养物, 质粒, 胚胎和种子将是我的责任。在规定的一段时间内提供足够量的保藏物也将是我的责任。

Ing. Jorge Suchil B. 2001 年 5 月 24 日

30 打印的签名

签名

日期

地址 Calle 30 No. 2614 Zona Industrial 44940 Guadalajara, Jalisco,
Mexico

传真: 52 3 668 80 80 电话: 52 3 668 8038 E-mail:
jsuchil@gua.boehringer-ingelheim.com

5

保藏物和表格需要寄给如下地址:

Patent Depository
American Type Culture Collection
10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209,
USA

10 保藏: 正如大多数国家的专利局所要求的, 保藏日期是自保藏日起 30 年内或自对该保藏物的最近一次请求之日内 5 年内, 取上述两者中长者。

收费: 请登陆我们的网站 www.atcc.org, 或是通过电邮 applied-sci@atcc.org, 或是打电话至 703-365-2700 来索取我们的收费单, 收费价格可能浮动。

15

由 ATCC 填写

ATCC 指定国 _____ 是否收到 _____ 存活实验结果 _____
保藏物名称 _____ 菌株指定国 _____

20

对此表格的不正确填写将会延误申请

请打印或清楚书写

<p>只有在填写了此表格并且其中的信息被证实了之后 (9CFR 94, 95 和 122), 此申请中的受监控的物质, 生物或载体才能进入美国或在各州之间流动</p>		<p>根据 1995 年的 Paperwork Reduction 法案, 当用于收集信息的表格上没有显示有效 OMB 控制号码时, 任何人可以拒绝填写该表格。此信息表格的 OMB 控制号码为 0579-0015。针对每一表格上的信息, 本机构的工作时间大约为 1.6-3 小时, 包括阅读说明, 搜索现有的数据库, 收集并维持所需的数据, 以及完成和阅读所收集到的信息。</p>		<p>此表格的 OMB 许可号 0579-0015</p>	
<p>美国农业部 动植物健康检查服务中心 兽医服务中心 国家进出口中心, 产品项目 4700 River Road, Unit 40 Riverdale, MO 20737-1231 应用于: 进口和运输受监控材料或生物体或载体</p>		<p>1. 运输方式 <input type="checkbox"/> 空运 <input type="checkbox"/> 海运 <input type="checkbox"/> 陆运 <input type="checkbox"/> 其他</p>		<p>2. 进入的美国海关</p>	
<p>3. 进口者: 美国典型培养物保藏中心 10801, University Blvd. Manassas VA 20110-2209 电话: (703)365-2700, 传真: 365-2745</p>		<p>4. 发货人</p>			
<p>5. 对入关物品的描述 (请尽可能地提供下列信息: 动物种类, 动物产品源的组织, 此动物的原动物产品起源国家, 对此动物的处理国家, 重组系统, 基因插入片段, 抗体免疫原, 稳定剂, 动物源在培养基中的营养因子)</p> <p>25 个玻璃瓶, 其中装有冻干的 Avian Pasteurella trehalosi 以前被称为 Pasteurella haemolytica, 被鉴定为 BIV-4895</p>					
<p>6. 进口的数量, 次数, 以及预期的结束日期</p>					
<p>7. 该进口物品的预期使用目的 (对于动物病原体或载体, 请描述其实验室/生物安全过程)</p>					
<p>8. 如果是被用于动物, 请说明具体动物物种</p>					
<p>9. 在该物品被进口至美国之前对其进行的处理 (对其的处理纯化方法, 包括处理时间, 温度, pH 值, 其它处理, 疾病安全等级等)</p> <p>请见附件 4</p>					
<p>10. 对该进口材料或衍生物的最后处理方法</p>					
<p>由我所代表的公司/机构的授权, 我证明此物品的使用将遵守所有限定和规定</p>					
<p>11. 申请人签字</p>		<p>12. 打印清楚的名字和头衔</p>			
<p>13. 日期</p>		<p>14. 付款方式 (请注明信用卡类型及到期日)</p>			

VS 表格 16-3 (99 年 11 月)

附件 1

布达佩斯条约保藏

对问题 6 的回答

培养特性 该菌株能够生长于心脑浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion broth) (Difco)或胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptose Soy broth)。37℃下孵育约 6-8 小时达到对数生长期。

在血琼脂平板中, 于 37℃孵育 24 小时后出现生长峰值, 这种方法的优点是能够观察到溶血现象。

10 冻干保存. 细菌在心脑浸出液肉汤(Difco)中生长 6-8 小时。用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液, 按 1:1 (v/v)比例作为稳定剂。

存活力试验. 取一小瓶冻干物, 用 1ml 无菌 PBS 1X, pH 7.2 重配。用无菌 PBS, pH 7.2 作 10 倍系列稀释。每一稀释度各取 100 μ l 接种于血琼脂平板。37℃孵育 24 小时。用菌落计数方法检验存活力。

15

对问题 7 的回答。

7.1. BIV-4895

肉眼观察的形态

20 在绵羊血琼脂上培养 24 小时后长成的菌落, 直径 1.0-1.5 mm, 光亮半透明, 微凸起、低溶解度、干燥, β -溶血。

显微镜下观察到的形态

革兰氏-阴性, 不运动, 多形性杆状, 常呈现两极染色。

25 生化及其他试验

试验	反应
氧化酶	+
过氧化氢酶	+
吲哚	-
葡萄糖	+
蔗糖	+
MacConkey	+
脲酶	-
硝酸盐	+

麦芽糖	-
甘露醇	+
阿拉伯糖	-
纤维二糖	-
山梨醇	+
xilose	+
海藻糖	+
水杨苷	-
鸟氨酸	-
七叶苷	-
β 葡萄糖苷酶	-
α - 岩藻糖苷酶	-
β 半乳糖苷酶	+

附件 4

进入许可

对问题 6 的回答 (进入美国前材料的处理)

BIV-4895 菌株

- 5 1. 从产蛋母鸡胫裂中分离
2. 接种于营养肉汤(20 ml 购自 Difco 的 BHI)
3. 37°C 孵育 24 小时
4. 接种于绵羊血琼脂平板
5. 分离 β 溶血菌落
- 10 6. 接种于绵羊血琼脂平板
7. 鉴定(生化及其他试验)
8. 接种于购自 Difco 的 BHI
9. 细菌在 心脑浸出液肉汤(Difco)中培养 6-8 小时
10. 用 Bacto Skim Milk (Difco) 的 10% 无菌溶液, 按 1:1 (v/v)比例作为稳定
- 15 剂
11. 样本冻干
12. 生存力、纯度及生化试验



图 1

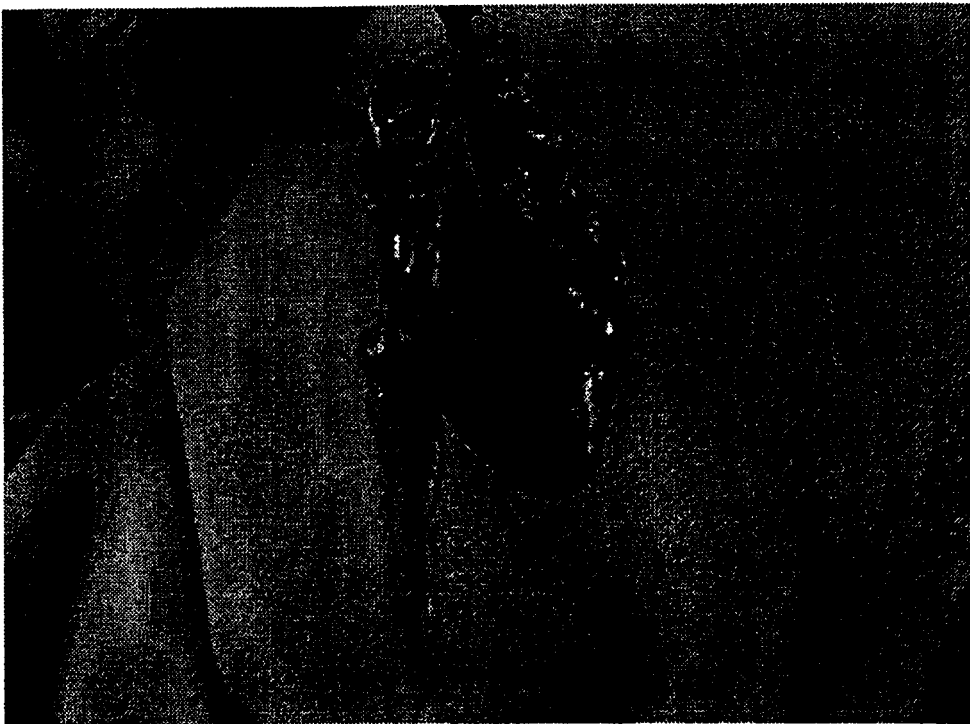


图 2



图 3

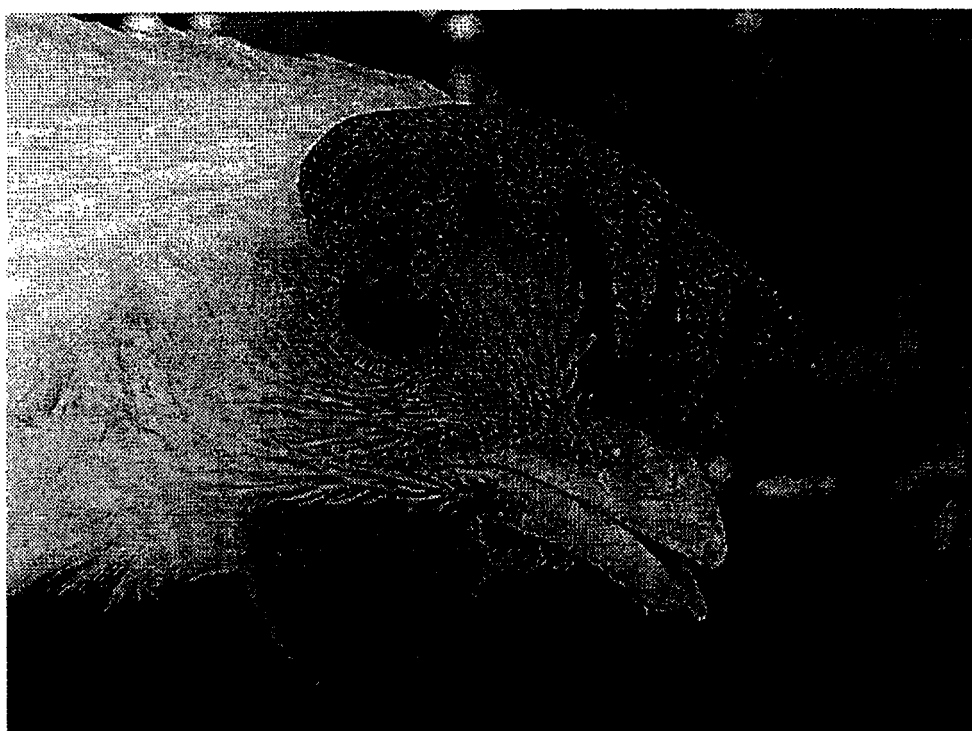


图 4



图 5



图 6



图 7



图 8



图 9

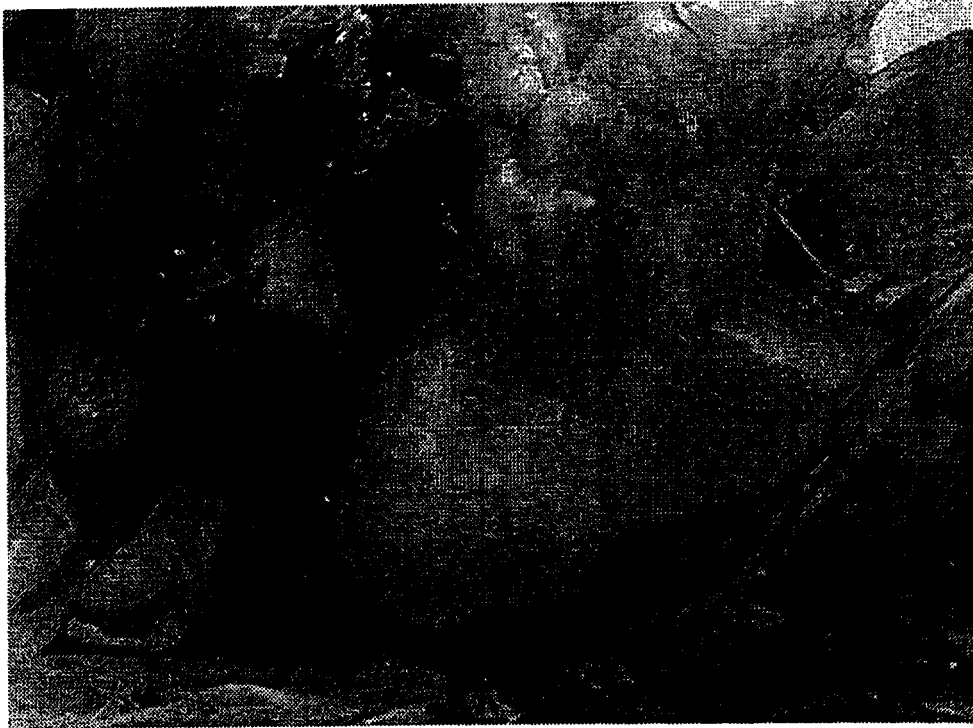


图 10



图 11

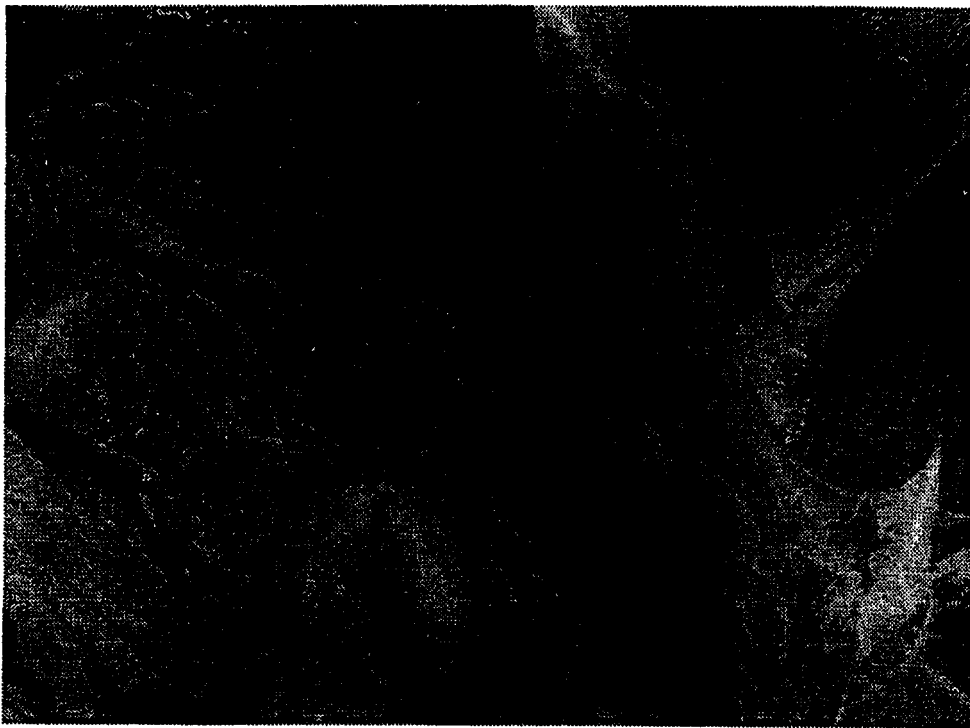


图 12



图 13

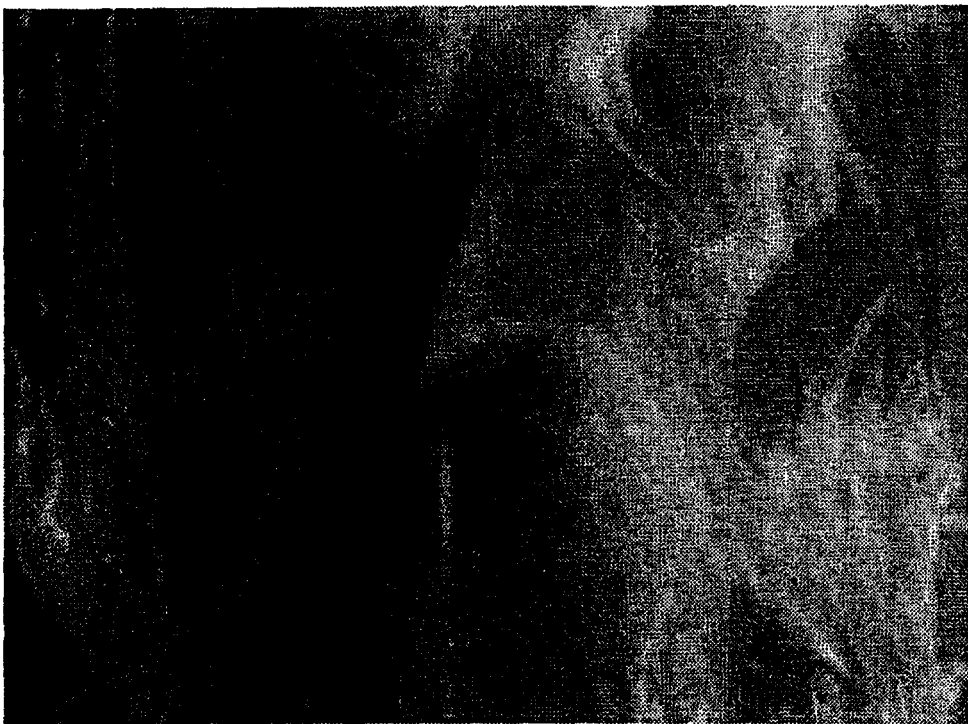


图 14

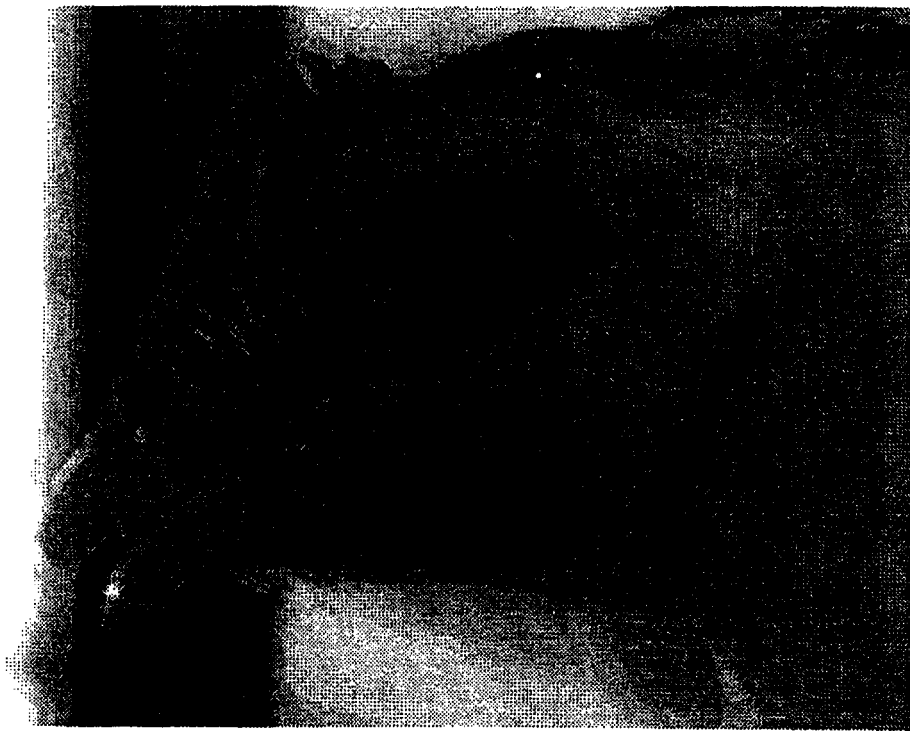


图 15



图 16

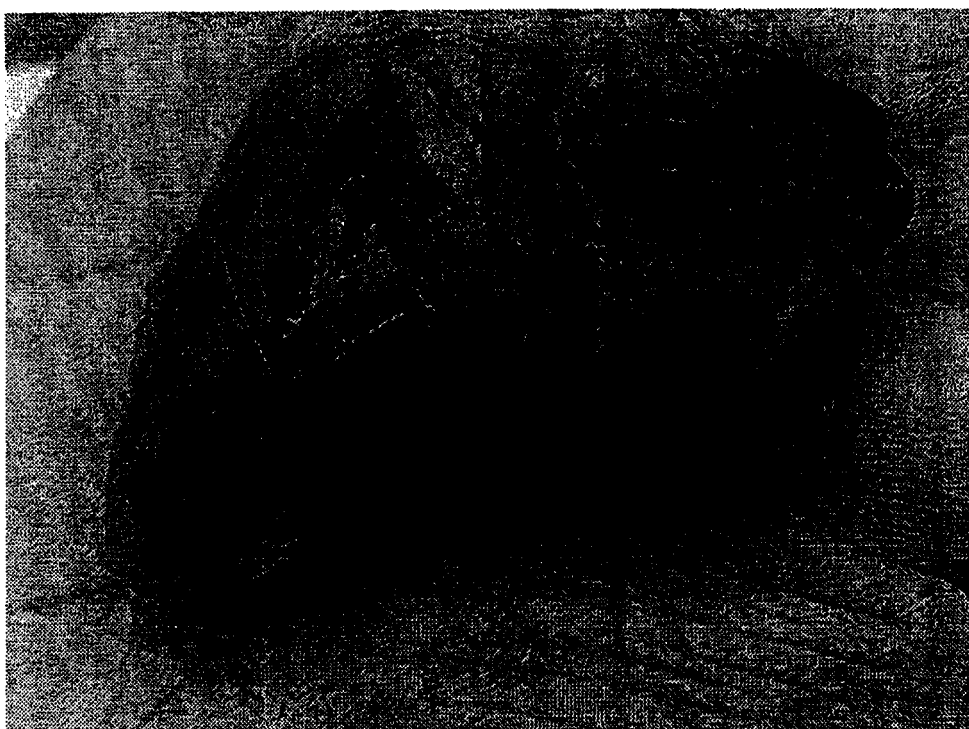


图 17

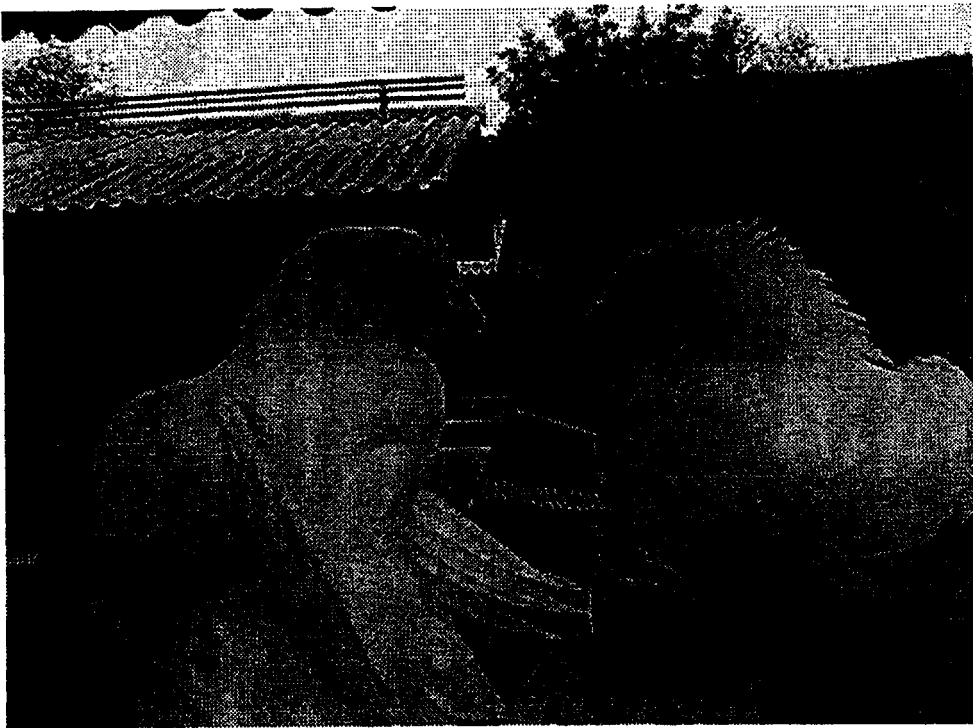


图 18

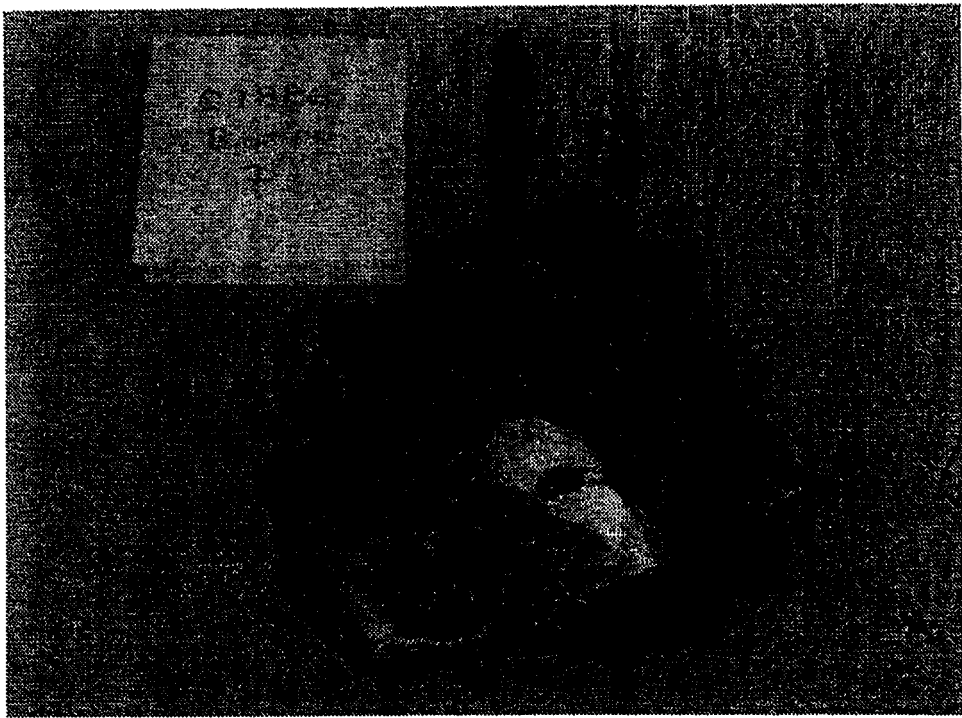


图 19

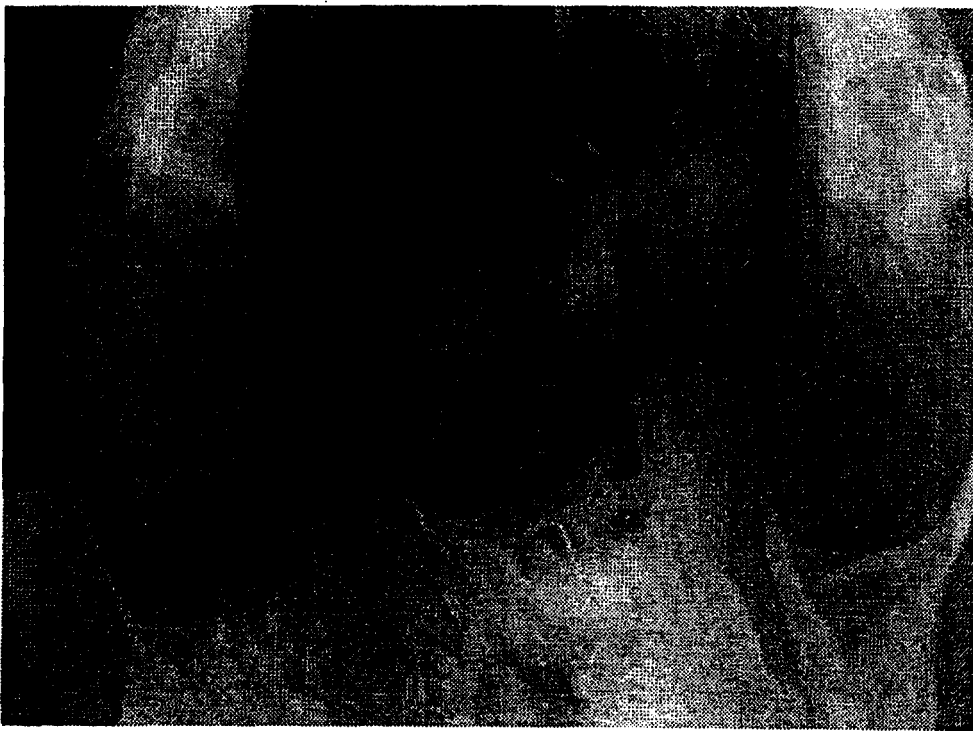


图 20

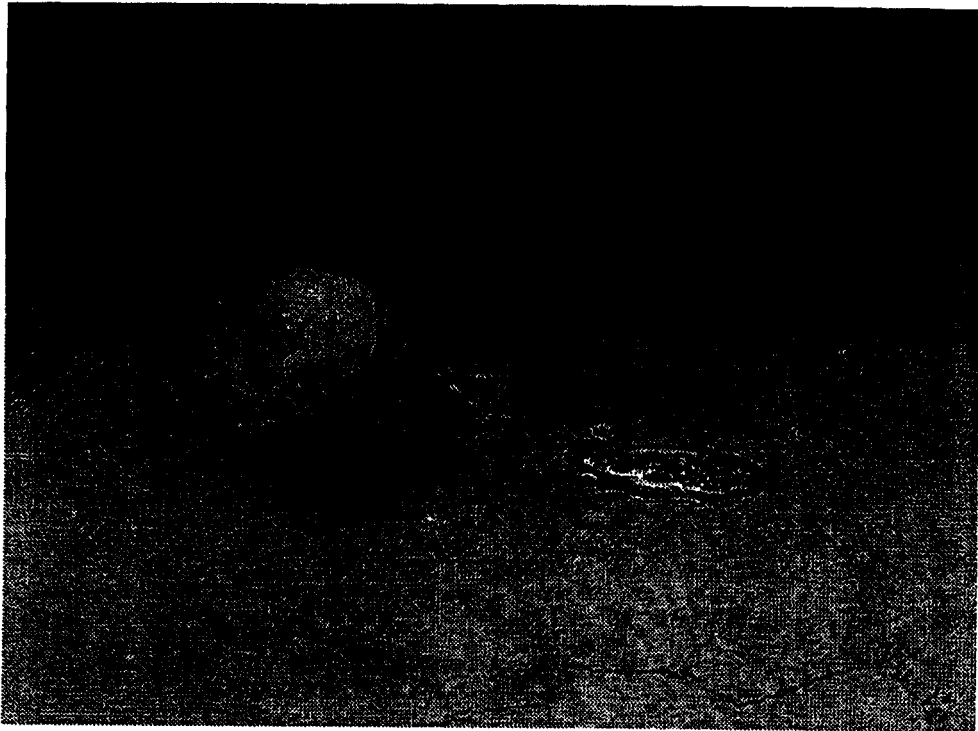


图 21

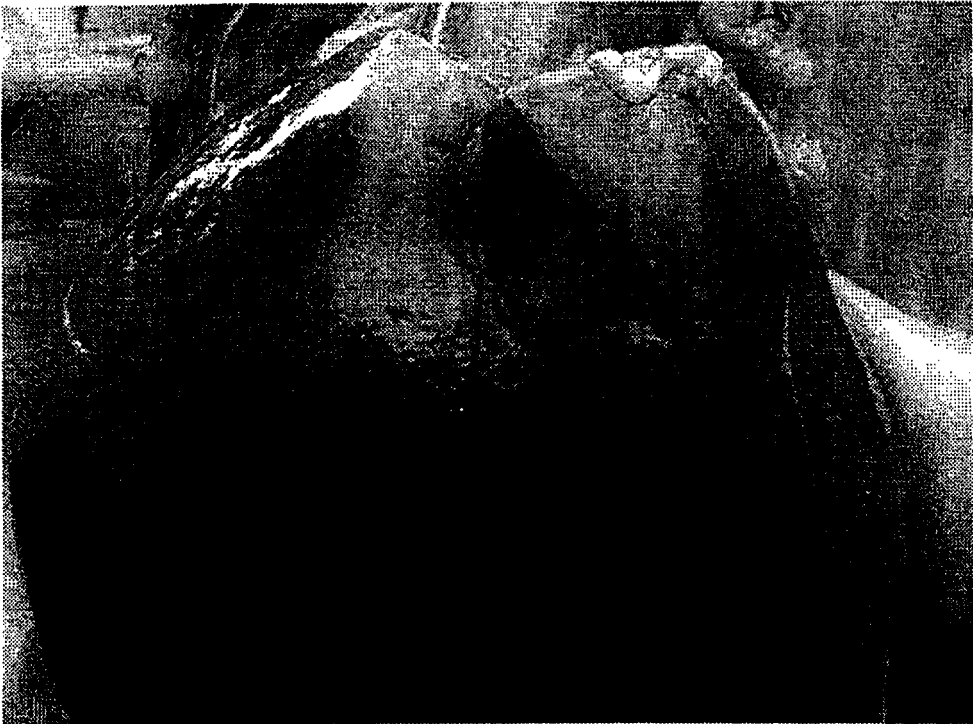


图 22

专利名称(译)	新的导致禽病的细菌和由其衍生的疫苗		
公开(公告)号	CN1575334A	公开(公告)日	2005-02-02
申请号	CN02821251.7	申请日	2002-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡公司		
当前申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡公司		
[标]发明人	玛丽亚B瓦兹奎兹 劳尔坎波加里多 卡洛斯冈萨雷斯赫南德兹 韦萨纳塞恩西瓦南登		
发明人	玛丽亚·B·瓦兹奎兹 劳尔·坎波加里多 卡洛斯·冈萨雷斯-赫南德兹 韦萨纳塞恩·西瓦南登		
IPC分类号	A61K39/102 A61K39/108 A61K39/12 A61K39/17 A61K39/193 A61K39/275 A61P11/00 A61P15/00 A61P31/04 A61P31/12 C07K14/195 C12N1/20 C12Q1/04 C12R1/01 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56911 A61K39/102 A61K2039/52 C07K14/195 C12R1/01 A61P11/00 A61P15/00		
优先权	10152307 2001-10-26 DE		
其他公开文献	CN100471945C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于动物健康领域，具体地是涉及一种新的细菌性禽病的致病因子，海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌。本发明提供了所述的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌细菌，一种含有灭活的海藻巴斯德氏菌和/或溶血性曼氏菌的疫苗，以及一种为防止鸡感染所述疾病而对鸡进行免疫的方法。

