



УКРАЇНА

(19) UA (11) 24540 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 1/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВІДНОВЛЕННЯ ВАКЦИННОГО ШТАМУ ТУЛЯРЕМІЙНОГО МІКРОБА

1

(21) u200613106

(22) 11.12.2006

(24) 10.07.2007

(46) 10.07.2007, Бюл. № 10, 2007 р.

(72) Юрданова Алла Миколаївна, Ганченко Марія Григорівна, Малинівська Броніслава Петрівна, Лозицький Віктор Петрович

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА

(57) 1. Спосіб відновлення вакцинного штаму туляремійного мікроба, що полягає у відборі субкультури вакцинного штаму збудника туляремії,

2

культивуванні штаму *in vivo* та *in vitro*, селекції одержаної культури, який **відрізняється** тим, що культивування *in vivo* здійснюють одноразово, після чого готують модельне біосередовище для наступного одно-, кількарізного культивування вакцинного штаму *in vitro* при температурі  $37,0 \pm 0,5$  °C впродовж 24-48 годин.

2. Спосіб відновлення вакцинного штаму туляремійного мікроба за п. 1, який **відрізняється** тим, що модельне біосередовище готують з кролячої або людської сироватки, розведеної фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1.

Корисна модель відноситься до галузі медицини та біотехнології, зокрема - до медичної мікробіології, а саме - відновлення основних властивостей вакцинного штаму.

При тривалому зберіганні в мікробіологічному музеї вакцинні штами бактеріальних особливо небезпечних інфекцій (сибірської виразки, чуми, туляремії) з часом втрачають деякі свої особливості, зокрема, імуногенність та залишкову вірулентність. Для наукової розробки та промислового випуску якісних бакпрепаратів з особливо небезпечних інфекцій, вивчення особливостей інфекційних процесів, важливо підтримувати селекційовані вакцинні штами на належному рівні, з якомога нижчими трудовими та економічними витратами.

Відомі різні способи відновлення штамів, які включають селекційний відбір бактеріальних культур, синтез способів культивування бактерій *in vitro* - на поживних середовищах, та *in vivo* - в організмі теплокровних. Так, патент РФ на винахід №2163265 [1] дозволяє підвищити ріст мікроорганізмів, які частково втратили життєздатність, шляхом одноразової обробки суспензії мікроорганізмів в електроліті електричним полем, з подальшими пасажами на поживних середовищах.

Патент РФ на винахід №2102484 [2] дозволяє підвищити вірулентність збудника сибірської виразки та селекції штамів, що мають задані властивості, шляхом відбору субкультури, обробки її та послідовних пасажів *in vivo* на білих мишах та *in*

*vitro* - на поживних середовищах.

Наведені вище способи, хоча і сприяють відновленню штамів, але не дозволяють диференціювати імуногенні та неімуногенні варіанти мікроорганізмів, тобто, одержувати вакцинні форми штамів. Запропоновані способи відновлення штамів чуми та сибірської виразки не можуть бути цілком втілені для відновлення туляремійного вакцинного штаму, враховуючи відмінні характеристики вакцинних штамів збудників різних особливо небезпечних інфекцій.

Відомий також спосіб відновлення туляремійного вакцинного штаму [3], що полягає у кількарізових інтратестикулярних пасажах культури на морських свинках, з контрольними проміжними пасажами на елективному поживному середовищі. Незважаючи на ефективність такого способу відновлення вакцинного штаму, він має суттєві недоліки, як то - довгий термін виконання та значні трудові та економічні затрати.

Найбільш близьким методом, який прийнятий за прототип запропонованої корисної моделі, є патент РФ на винахід №2155962 [4]. Спосіб передбачає відбір необхідної субкультури вакцинного штаму збудника туляремії, наступні кількарізові пасажі культури чумного мікроба *in vivo* - в організмі біопробних тварин (безпородні білі миші), з подальшими пасажами на поживних середовищах *in vitro*. Винахід дозволяє створити оптимальні умови для відновлення продукції капсульного антигену у штамів чумного мікроба, що втратили його

(13) U

(11) 24540

(19) UA

біосинтез внаслідок фенотипової мінливості. Відбір найбільш типових культур мікроба (селекція), що її проводили з метою відновлення втрачених властивостей штаму, здійснювалась шляхом введення біопробної тварини *in vivo* суміші культури та певного складу інгредієнтів.

Недоліком прототипу для використання його в заявленій моделі є необхідність багаторазових повторів методу *in vivo* біопробним тваринам для досягнення результату, а також відсутність можливості виділити вакцинні форми (SR-форми) культури.

Задачею способу відновлення вакцинного туляремійного штаму є оптимізація його шляхом введення етапу селективного відбору найбільш імуногенних форм збудника туляремії, що забезпечує підвищення залишкової вірулентності, а також значне скорочення терміну відновлення штаму та здешевлення цього процесу, насамперед, за рахунок скорочення кількості біопробних тварин.

Задача досягається тим, що у способі відновлення вакцинного штаму, наприклад, туляремійного мікроба, культивування *in vivo* здійснюють одноразово, після чого готують модельне біосередовище для наступного одно-, кількарізного культивування вакцинного штаму *in vitro* при температурі  $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  протягом 24-48 годин. Модельне біосередовище готують з кролячої або людської сироватки, розведеної фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1.

Запропонований спосіб відновлення туляремійного вакцинного штаму реалізують наступним чином. Пасаж *in vivo*. Здійснюють одноразовий пасаж суспензії (0,2-0,5мл) досліджуваної культури в фізіологічному розчині в концентрації  $10^3$ - $10^5$  м.к./мл підшкірно біопробним тваринам (білі миші). Через 15-20 діб, після патанатомічного розтину, проводиться пасаж біопробного матеріалу на елективне середовище Мак-Коя (2-3 пасажі) - культивування при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  впродовж 48-72 год.

Селекція найбільш імуногенних варіантів культури *in vitro*. Для туляремійного вакцинного штаму наступні пасажі *in vivo* замінюються одноразовим пасажем *in vitro* на 50% сироватці теплокровних (модельне біосередовище). За основу брали методику, що полягає у врахуванні високої патогенності туляремійного мікроба для організму людини та тварин, безпосередньо - різної чутливості вірулентних, авірулентних та атенуйованих культур збудника туляремії до бактерицидної дії сироватки деяких теплокровних [5]. На даному етапі готують модельне біосередовище - 50% сироватку крові теплокровних. Нормальна сироватка крові людини готується на станції переливання крові, розливається в стерильні пробірки по 1мл та зберігається при  $t = -10^\circ\text{C}$ . Сироватку від тварин (морські свинки, кролики) одержують *ex tempore* способом, що передбачає: розлив крові (без консерванту) до стерильних пробірок (до 5мл), витримання при  $t = 37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  протягом однієї години, після чого ретельно відокремлюють кров'яний згусток від стінок пробірки та дають відстоятися при  $t = 4 \pm 0,5^\circ\text{C}$  протягом 1-2 год. Після цього пастерівською піпеткою обережно відбирають сироватку, переносять її до пробірок в об'ємі 1,0мл та зберігають при  $-10^\circ\text{C}$ .

Перед використанням модельного середовища нормальну сироватку розводять фізіологічним розчином 1:1 та одержують робочу концентрацію 50% нормальної людської сироватки (НЛС) або нормальної кролячої сироватки (НКС). Одержання культури відновленого туляремійного вакцинного штаму: Бактерії суспендують у фізіологічному розчині, змиваючи з поверхні щільного жовткового середовища Мак-Коя. Отриману завись (1 млрд. за галузевим стандартним зразком мутності) титрують у фізіологічному розчині до  $10^7$  м.к./мл, потім 0,1мл цієї зависі засівають в 1,0мл 50% НКС, з подальшим інкубуванням при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  протягом 24-48 годин. Після цього 0,1мл отриманої зависі культури висівають на чашки Петрі з туляремійним FT-агаром та проводять культивування при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  впродовж 48 - 72 годин. Одержують ізольовані імуногенні SR-колонії вакцинного штаму, які мають залишкову вірулентність та характеризуються мінімальним ступенем дисоціації.

Для накопичення бактеріальної маси одержані SR-колонії культують кількарізово на елективних середовищах - щільному жовтковому середовищі Мак-Коя та туляремійному FT-агарі 3-4 рази, контролюють відповідно до вимог НТД та зберігають у напіврідкому (0,7% FT-агарі) або ліофілізованому стані.

Запропонований спосіб, у порівнянні з прототипом, обумовлює:

- 1) можливість відновити життєздатність імуногенних форм вакцинного туляремійного штаму, що мають залишкову вірулентність;
- 2) значно коротший термін виконання (1 місяць проти 2-3-місячного терміну);
- 3) одноразове проведення пасажів *in vivo* замість 3-4-разових.

Таким чином, запропонована сукупність ознак способу забезпечує підвищення залишкової вірулентності, а також значне скорочення терміну відновлення штаму та здешевлення цього процесу, насамперед, за рахунок скорочення кількості біопробних тварин.

Приклад 1. Завись культури вакцинного туляремійного штаму у фізіологічному розчині розтирали до концентрації  $1 \times 10^7$  м.к./мл, засівали в кількості 0,1мл у пробірку з 1мл 50% НКС (модельне біосередовище). Інкубували при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  - 24 год. Наступний висів 0,1мл зависі із пробірки на чашку Петрі з FT-агаром виявив 58 ізольованих імуногенних SR-колоній вакцинного штаму.

Приклад 2. Завись культури вакцинного туляремійного штаму у фізіологічному розчині розтирали до концентрації  $1 \times 10^7$  м.к./мл, засівали в кількості 0,1мл у пробірку з 1мл 50% НЛС (модельне біосередовище). Інкубували при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  - 48 год. Висів 0,1мл зависі із пробірки на чашку Петрі з FT-агаром виявив 88 ізольованих імуногенних SR-колоній вакцинного штаму. Аналогічним чином виконували наступні (2-й та 3-й) пасажі та накопичували імуногенні колонії у трикратному розмірі.

Джерела посилань

1. Патент РФ №2163265 Спосіб культивірування мікроорганізмів. Дата подачі заявки: 1999.04.27. Заявитель (патентообладатель): Ста-

вропольский научно-исследовательский противочумный институт. Дата публикации: 2001.02.20.

2. Патент РФ №2102484 Способ восстановления вирулентности штаммов сибирязвенного микроба. Дата подачи заявки: 1995.01.31. Заявитель (патентообладатель): Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Дата публикации: 1998.01.20.

3. Олсуфьев, «Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляре-

мии» - Москва, 1975, стр.110, 113.

4. Патент РФ №2155962 Способ восстановления способности к биосинтезу капсульного антигена чумного микроба Дата подачи заявки: 1999.02.04. Заявитель (патентообладатель): Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Дата публикации: 2000.09.10.

5. Методические рекомендации по оценке вирулентности штаммов *Francisella tularensis* in vitro, Ростов-на-Дону, 1994.