



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38862 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/245МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТИМУЛЯЦІЇ ПРОТИВІРУСНОГО ІМУНІТЕТУ У СВИНЕЙ

1

2

(21) u200809101

(22) 11.07.2008

(24) 26.01.2009

(46) 26.01.2009, Бюл.№ 2, 2009 р.

(72) БУЗУН АНДРІЙ ІГОРОВИЧ, UA, СТЕГНІЙ БО-
РИС ТИМОФІЙОВИЧ, UA, СОЛОВЙОВ СЕРГІЙ
ТИХОНОВИЧ, UA, ВОВК СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИ-
ТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕ-
РИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", UA(57) Спосіб стимуляції противірусного імунітету у
свиней, що включає змішування біомаси бактерій

бешихи та вакцинного вірусу, висушування отри-
маної суміші, який **відрізняється** тим, що біомасу
вірусів класичної чуми свиней, хвороби Ауескі,
тешенської хвороби адсорбують на біомасі бакте-
рій бешихи, концентрованих до 1,0-1,5млрд. в 1см³
у різному для кожного вірусу діапазоні рН, за тем-
ператури 4-8°C, та використовують бактерії бешихи
з адсорбованим вірусом (вірусами) для стабілі-
зації вірусів та посилення противірусного імунітету
свиней (зокрема, диких кабанів).

Корисна модель відноситься до ветеринарної
вірусології, а саме до способів стимуляції імунітету
диких та домашніх свиней проти вірусних хвороб.

Контроль особливо небезпечних хвороб сви-
ней - класичної чуми (КЧС), тешенської хвороби
(ТХ), хвороби Ауескі (ХА) у США, Канаді, країнах
Європейського союзу здійснюється, зокрема, шля-
хом перорального щеплення диких кабанів, які
вважаються джерелом збудників зазначених хво-
роб для свійських свиней.

Відомий спосіб стимуляції імунітету свині про-
ти хвороби Ауескі, в якому суху культуральну віру-
свакцину зі штаму «ВГНКІ» для усунення загрози
інактивації вірусу у шлунку змішують у певних
співвідношеннях з яблучним пектином та магнєзі-
єю, додають у відвійки й згодовують свиням після
голодної дієти [Профилактика инфекционных бо-
лезней животных, Минск, 1988, с.158-162]. Хоча
вакцинний вірус надійно захищається цим спосо-
бом від інактивації у шлунково-кишковому тракті,
недоліком способу є відсутність у ньому елементу
додаткової імуностимуляції ад'ювантами, тому
таким способом неможливо створити рівний гру-
повий імунітет.

Відомий також спосіб пероральної вакцинації
свиней, в якому використовують вірусвакцину зі
штамів типу «К» (ЛК-К тощо), адсорбовану на іо-
нообмінній смолі КБ-ЧП-2 та включену у склад
принади разом з аеросилом АМ 1-300 [Вакцина
против классической чумы свиней для перораль-
ной иммунизации. АС. №93025888, кл.

А61К39/187, 1993.05.12]. У цьому способі роль
стабілізатора вірус-вакцини виконує смола, а роль
ад'юванту, що стимулює імунну систему свині -
аеросил, який є дуже ефективним подразником
мигдаликів свині (органу-мішені багатьох інфек-
ційних агентів, специфічних для свині). Але реалі-
зація цього способу потребує складного устатку-
вання (апарат висушування у потоці, шаровий
млин тощо) та дотримання багатьох технологічних
параметрів у перебігу виготовлення цільового
препарату з великої кількості компонентів, цільо-
вий препарат має відносно високу собівартість,
сухий аеросил цільового продукту є сильним алер-
геном для свиней.

Найбільш близьким рішенням, що заявляється
є спосіб імунізації диких та свійських свиней віру-
свакциною зі штамів типу «К» («АСВ» тощо), з ви-
користанням у якості ад'юванту бактерій бешихи
[Збірник Біловежська пуца. Мінськ. "Урожай",
1976р.]. За цим способом вірусвакцину штаму К
змішують з бактеріями бешихи штаму ВР2 і віру-
с-бактеріальну суміш згодовують свиням у складі
принад, п'ятиразове, до досягнення достатнього
рівня імунітету. У цьому способі бактерії бешихи
відіграють роль «помічника» вірусвакцини, оскіль-
ки вони легко долають бар'єрну функцію слизової
шлунково-кишкового тракту і дуже збуджують ор-
гани імунітету, зокрема мигдалики та Бартолінієві
залози. У створених бактеріями бешихи вакцинно-
го штаму ВР2 умовах, вірусвакцина активно та у
достатній кількості проникає в органи-мішені, що

(13) U
(11) 38862
(19) UA

сприяє утворенню напруженого противірусного імунітету.

Недоліком способу є його нестандартність через принципову технічну ваду відомого рішення: за різних умов докільля вакцинний вірус, навіть ліофілізований разом з бактеріями бешихи, з непередбачуваною швидкістю втрачає імунізуючу активність. Це є причиною поганої відтворюваності способу, а також причиною багаторазового застосування вірусвакцини «всліпу» - без гарантії збереження імунізуючої активності вірусвакцини.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб стимуляції противірусного імунітету у свиней, що включає змішування біомаси бактерій бешихи та вакцинного вірусу, висушування отриманої суміші, шляхом адсорбції біомаси вірусів класичної чуми свиней, хвороби Ауескі, тешенської хвороби на біомасі бактерій бешихи концентрованих до 1,0-1,5млрд. в 1см³ у різному для кожного вірусу діапазоні рН, за температури 4-8°C, використання бактерій бешихи з адсорбованим вірусом (вірусами) для стабілізації вірусів та посилення противірусного імунітету свиней (зокрема, диких кабанів), щоб забезпечити ефективність способу.

У способі пероральної стимуляції противірусного імунітету диких та свійських свиней, бактерії бешихи виконують роль не лише «активатора» імунної системи, що готує її до швидкої та повноцінної реакції на вірусвакцину (тобто роль ад'юванта), але й стабілізатора останньої, оскільки вони у фізико-хімічному аспекті за певних умов можуть розглядатися як фізичні частинки, на яких може адсорбуватися і таким чином стабілізуватися вірус. Пропоноване рішення включає адсорбцію на концентрованих до 1,0-1,5млрд. в 1см³ бактеріях бешихи ВР2 вакцинного вірусу класичної чуми свиней штаму «К», хвороби Ауескі штаму «ВГНКІ», тешенської хвороби штаму «Бучач», яка відбувається у певному для кожного з зазначених вірусів діапазоні кислотності (рН), за умов постійного чи періодичного перемішування суміші упродовж 40-48 годин за температури 4-8°C. Не адсорбований вірус декантують після осадження бактерій бешихи низькошвидкісним центрифугуванням, осад ресуспендують у забуференому фізіологічному розчині з рН (7,2-7,4) згодують свиням, у нативному вигляді чи у складі принад. Головним критерієм ефективності пропонованого рішення є зберігання та застосування цільового продукту за умови збереження життєздатності бактерій бешихи, на яких адсорбовано зазначені віруси. У свиней, імунізованих пропонованим способом, розвивається напружений противірусний імунітет - не лише гуморальний, але й мукозальний.

Порівняльний аналіз заявленого рішення з прототипом дозволяє зробити висновок, що бактерії бешихи, по-перше, використовуються у якості «адсорбенту», а не лише у якості «ад'юванту», а, по-друге, вони використовуються для стабілізації та додаткової стимуляції імунітету не лише проти класичної чуми свиней, але й проти хвороби Ауескі та тешенської хвороби, що відповідає критерію «новизна».

Приклади виконання способу.

Приклад 1.

Перед виконанням способу 50см³ вірусвакцини проти класичної чуми свиней (наприклад, вакцина «АСВ» Херсонської державної біологічної фабрики з активністю 4,5-5,0lg фокусоутворюючих одиниць, ФУО_{50/см³}) освітлювали центрифугуванням при 3000g впродовж 45 хвилин. Потім у флаконі відповідної ємності на магнітному міксері при постійному перемішуванні, до неї додавали 25см³ вакцини живої проти бешихи (наприклад, вакцина зі штаму ВР-2 Херсонської державної біологічної фабрик з активністю 150-200млн. б.к. на 1см³). Значення рН бактерійно-вірусної суміші підводили за допомоги стерильного 0,25% розчину кислого фосфорнокислого натрію до рН 7,0-7,6 (за кольором лакмусового папірця). Суміш при постійному перемішуванні впродовж 48 годин інкубували при 4-8°C в холодильнику. Після цього суміш розбавляли м'ясопептонним бульйоном до концентрації бактерії бешихи приблизно 150000-250000б.к. на 1см³ (за стандартом каламутності) і перорально вводили 3-м інтактним підсвинкам 4-місячного віку п'ятиразово, раз на добу, з 2-3-добовим інтервалом. Через 1 місяць після останнього введення препарату у підсвинків перевіряли наявність віруснейтралізуючих антитіл проти збудника класичної чуми свиней. Рівень таких антитіл був протективним (1:8-1:16).

Приклад 2.

20см³ вакцини живої проти бешихи (наприклад, вакцина зі штаму ВР-2 Херсонської державної біологічної фабрики з активністю 100-150млн. б.к. на 1см³) змішували у флаконі протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (22-24°C) з 20см³ культуральної вірусвакцини проти хвороби Ауескі (наприклад, вірусвакцина зі штаму «ВГНКІ» з музею ННЦ «ІЕКВМ» чи штаму «Бегонія» фірми «Інтервет», Нідерланди). Значення рН бактерійно-вірусної суміші підводили за допомогою стерильного 0,25% розчину кислого вуглекислого натрію до рН 7,2-7,4 (за кольором нейтрального червоного у культуральному середовищі). Суміш впродовж 48 годин інкубували при 4-8°C в холодильнику при періодичному перемішуванні впродовж 3-5 хвилин кожного разу, 3-5 раз на добу. Потім суміш розбавляли м'ясопептонним бульйоном до концентрації бактерій бешихи приблизно 150000-250000б.к. на 1см³ (за стандартом мутності) і перорально вводили 3-м інтактним підсвинкам 6-місячного віку тричі, раз на добу, з 2-3-добовим інтервалом. Через 1 місяць після останнього введення препарату у зразках сироваток крові підсвинків перевіряли наявність антитіл проти збудника хвороби Ауескі. Рівень таких антитіл в ELISA був 1:320-1:1200, що свідчить про наявність напруженого імунітету проти хвороби Ауескі.

Приклад 3.

20см³ вакцини живої проти бешихи (наприклад, вакцина зі штаму ВР-2 Херсонської державної біологічної фабрики з активністю 150-250млн. б.к. на 1см³) змішували у флаконі протягом 5 хвилин при кімнатній температурі (22-24°C) з 20см³ культуральної вірусвакцини проти тешенської хвороби (наприклад, вірусвакцина зі штаму «Бучач» Національного наукового центру «ІЕКВМ» з актив-

ністю 7,5lg ТЦД50/см³). Значення рН бактерійно-вірусної суміші підводили за допомогою стерильного 0,25% розчину кислого вуглекислого натрію до рН 8,5-9,5 і протягом 48 годин інкубували при температурі 4-8°C в холодильнику при періодичному перемішуванні впродовж 3-5 хвилин кожного разу, 3-5 раз на добу. Після цього бактерії бешихи осаджували центрифугуванням при 3000g впродовж 45 хвилин, розбавляли м'ясопептонним бульйоном до концентрації приблизно 150000-250000 б.к. на 1см³ (за стандартом мутності) і перорально вводили 3-м підсвинкам 4-місячного віку тричі, раз на добу, з 2-3-добовим інтервалом. Че-

рез 1 місяць після останнього введення препарату у підсвинків перевіряли наявність віруснейтралізуючих антитіл проти збудника тешенської хвороби. Рівень таких антитіл був протективним (1:8-1:16).

У способі пероральної стимуляції протівірусного імунітету диких та свійських свиней, бактерії бешихи виконують роль не лише «активатора» імунної системи, але й стабілізатора останньої. У свиней, імунізованих пропонованим способом, розвивається напружений протівірусний імунітет - не лише гуморальний, але й мукозальний.