



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52026** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
A61K 39/085

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ІНАКТИВОВАНОЇ АСОЦІЙОВАНОЇ ПРОТИ РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТЕЛЯТ, СПРИЧИНЕНИХ УМОВНО-ПАТОГЕННОЮ МІКРОФЛОРОЮ**

1

2

(21) u201001673

(22) 17.02.2010

(24) 10.08.2010

(46) 10.08.2010, Бюл.№ 15, 2010 р.

(72) РУДЕНКО АНАТОЛІЙ ФЕДОРОВИЧ, РУДЕНКО АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, РУДЕНКО ПАВЛО АНАТОЛІЙОВИЧ, ВОБЛІКОВА ОЛЬГА ОЛЕКСАНДРІВНА

(73) ЛУГАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб виготовлення вакцини інактивованої асоційованої проти респіраторних захворювань

телят, спричинених умовно-патогенною мікрофлорою, який включає культивування з місцевих осередків епізоотичних штамів ешерихій, пастерел, стрептококів та протеїв для накопичення бактерійної маси, виготовлення корпускулярного інактивованого антигену, додавання ад'юванту та визначення рівня протективного захисту одержаного препарату, який **відрізняється** тим, що до суспензії інактивованих мікроорганізмів додають: ад'ювант на основі гліцерину (20 % від об'єму антигену).

Корисна модель, що передбачається, відноситься до ветеринарної мікробіології, епізоотології, імунології та біотехнології, зокрема до способів виготовлення інактивованих вакцин, а саме для специфічної профілактики респіраторних захворювань молодняку великої рогатої худоби, зумовлених асоційованою дією умовно-патогенних мікроорганізмів і може використовуватися у тваринницьких господарствах різних форм власності.

Існують способи одержання «Способ получения препарата на основе вирусно-бактериальных штаммов из местного очага для приготовления ассоциированной вакцины или поливалентной гипериммунной сыворотки против заболеваний крупного рогатого скота» [патент РФ №2147892, опубл.27.04.2000]; «Процес одержання вакцини «Мультивак» для профілактики і терапії масових хвороб тварин, зумовлених дією асоційованого інфекційного етіологічного фактора» [патент України №6097, опубл.15.04.2005, бюл. №4], що передбачають виділення з місцевого осередку епізоотичних штамів збудників захворювань, накопичення біомаси культур збудників мікробіологічним методом та інактивацію отриманої біомаси хімічним реагентом. Данні препарати є близькими за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється.

За допомогою зазначених вище корисних моделей можливо ефективно руйнувати інфекційну активність різноманітних збудників, майже не тор-

каючись їхньої антигенної активності, що є цінним для біологічної промисловості. Проте, вони є в достатній ступені жорсткі, вкрай канцерогенні та токсичні, навіть у залишкових концентраціях, а робота з ними вимагає використання спеціальних запобіжних заходів. Також, недоліком існуючих способів є те, що при застосуванні, одержані препарати не забезпечують захист чутливих тварин від дії асоційованого інфекційного фактора, що обумовлює масові захворювання молодняку сільськогосподарських тварин. Збудниками таких захворювань переважно виступають умовно-патогенні бактерії, що мають в своїй антигенній структурі комплекс факторів патогенності.

Найбільш близьким технічним рішенням до об'єкту, що заявляється, може бути «Вакцина «Пневмомастисан», асоційована інактивована концентрована проти пневмоентеритів, ендометритів і маститів тварин» [патент України № 12950, опубл. 15.03.2006, бюл. № 3]. Цей спосіб включає дослідження ізольованих при масових хворобах тварин мікроорганізмів, проведення ідентифікації та виявлення ознак патогенності, відбір і проведення селекції мікроорганізмів з високим патогенним потенціалом, культивування відібраних бактерій для накопичення біомаси, виготовлення комплексного інактивованого антигену та додавання стабілізуючого і антиоксидантного засобу у вигляді екстрактів лікарських рослин, ад'юванту на основі гідроксиду алюмінію. Недоліком даного методу є відносна висока реактогенність та низька

(13) **U**  
(11) **52026**  
(19) **UA**

імуногенність через використання гідроксиду алюмінію в якості ад'юванта.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, який дозволив би отримати універсальний препарат на основі місцевих бактеріальних штамів для приготування інактивованої асоційованої вакцини проти респіраторних захворювань молодняку великої рогатої худоби, яка забезпечує більш тривалий та напружений імунітет і більш специфічна для телят даного регіону, таким чином вакцина діє більш ефективно.

Застосування в якості ад'юванту дистильованого гліцерину в 0,9% розчині натрію хлориду сприяє більш повільнішому визволенню антигенів з вакцини, а тривале стимулювання імунної системи призводить до виникнення більш стійкого імунітету.

Задача корисної моделі вирішується тим, що девіталізацію виробничих культур ешерихій, пастерел, стрептококів та протеїв проводять за допомогою 0,3% водного розчину перекису водню та 0,1% водного розчину формальдегіду, з наступною інкубацією одержаної суміші при 37,0-38,0°C протягом 15 годин та додавання до корпускулярних інактивованих антигенів ад'юванту на основі гліцерину (20% від об'єму антигену).

Спосіб виконується таким чином:

1) Проводять бактеріологічні дослідження біологічного матеріалу від загинув телят з ознаками респіраторних або респіраторно-кишкових уражень для виділення збудників захворювання;

2) З метою ідентифікації та визначення біологічних властивостей досліджують ізолювані культури умовно патогенних бактерій і виявляють у них ознаки патогенності (визначення ЛД<sub>50</sub> в тесті летальності для білих мишей);

3) На підставі одержаних даних проводять відбір і селекцію мікроорганізмів із високим патогенним потенціалом;

4) Проводять культивування відібраних мікроорганізмів з метою накопичення біомаси;

5) Виготовляють корпускулярний антиген, який інактивують за допомогою 0,3 % розчину перекису водню та 0,1 % водного розчину формальдегіду при експозиції 15 годин;

6) Вносять до корпускулярного інактивованого антигену ад'ювант (дистильований гліцерин в 0,9% розчині натрію хлориду);

7) Складають серію вакцини, фасують, укупорюють, закатують, етикетують;

8) Проводять контроль вакцини;

9) Забезпечують пакування, транспортування, зберігання готового препарату.

Порівняльний аналіз з відомими технічними рішеннями в галузі ветеринарної мікробіології та біотехнології дозволяє зробити висновок, що в основі виготовлення вакцини інактивованої асоційованої проти респіраторних захворювань телят використовується ад'ювант на основі дистильованого гліцерину в 0,9% розчині натрію хлориду, що відповідає критеріям «новизна» та «суттєві ознаки».

Приклад 1. Виробничі штами умовно-патогенних бактерій.

З метою виготовлення вакцини інактивованої асоційованої проти респіраторних захворювань

телят, спричинених умовно-патогенною мікрофлорою використовували епізоотичні штами бактерій з місцевих осередків, а саме: *E.coli* серовару O8 (№ 11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5), які були ізолювані в тваринницькому господарстві СТОВ «Степове» Слов'янсько-сербського району Луганської області від загинув телят групи 0-2, які хворіли на респіраторні захворювання.

Приклад 2. Накопичення бактерійної маси умовно-патогенних бактерій.

Для виготовлення вакцини, накопичення бактеріальної маси умовно-патогенних бактерій проводили на МПА з додаванням 10,0 % дріжджового аутолізу крові (ДАК) у 1,5 л матрачних колбах.

Матричні культури епізоотичних штамів *E. coli* серовару O8 (№ 11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5) вирощували у пробірках з 9,0 см<sup>3</sup> МПБ за температури 37,5±0,5°C на протязі 20,0±2,0 годин з розрахунку 1 пробірка на матрац з 250,0 см<sup>3</sup> щільним поживним середовищем.

Культурами бактерій що вирости, засівали матраци, які після висіву витримували агаром вниз при кімнатній температурі 20-30 хвилин, а потім перевертали агаром догори, розташовували в термостаті і вирощували за температури 37,5±0,5°C впродовж 18-22 годин в залежності від накопичення біомаси.

Після візуальної перевірки чистоти росту культур, робили мазки, які фіксували над полум'ям спиртівки і фарбували за Грамом. Суспензії бактерій були типовими до штамів *E. coli* серовару O8 (№ 11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5) і не мали домішок сторонніх бактерій.

З матраців зливали конденсат і в кожную матрацну колбу наливали по 15,0-20,0 см<sup>3</sup> стерильного фосфатно-буферного фізіологічного розчину. Біомасу бактерій змивали коливанням матрацу.

Суспензії умовно-патогенних мікроорганізмів стандартизували шляхом вимірювання об'єму і визначення кількості мікробних клітин, яку проводили за стандартом каламутності ДНКІБШМ (1,0·10<sup>9</sup> мікробних клітин в 1 см<sup>3</sup>). Встановлювали концентрацію 12·10<sup>9</sup> мікробних клітин шляхом додавання стерильного фосфатно-буферного фізіологічного розчину.

Приклад 3. Виготовлення корпускулярного антигену.

В отриману стандартизовану мікробну завись штамів *E. coli* серовару O8 (№ 11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5) додавали інактиватори (32,3-32,6% розчин перекису водню та 38,0 % розчину формальдегіду, для одержання кінцевої їх концентрації відповідно у 0,3 % та 0,1 %). Після чого витримували впродовж 15,0 годин за температури 37,5±0,5°C для повної девіталізації.

Проводили об'єднання антигенних препаратів, виготовлених з виробничих штамів *E. coli* серовару O8 (№11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5) у співвідношенні 0,57:1,0:1,0:0,35, після чого вимірювали концентрацію мікробних тіл в одержаній бактеріальній масі, суспензію бактерій доводили фосфат-

но-буферним розчином до густоти  $12,0 \text{ млрд. м.к./см}^3$ . До корпускулярних антигенів додавали при постійному перемішуванні дистильований гліцерин в розчині 0,9% натрію хлориду (20% від об'єму антигену). Конструювання вакцини проводили з таким розрахунком, щоб в  $1,0 \text{ см}^3$  готового імунологічного біопрепарату містилося  $10 \cdot 10^9$  мікробних клітин.

Приклад 4. Контроль вакцини.

Стерильність і повноту інактивації вакцини інактивованої асоційованої проти респіраторних захворювань телят, спричинених умовно патогенною мікрофлорою визначали за ДСТУ 4483. Вакцина була стерильною.

Нешкідливість вакцини визначали за ГСТУ 46.024-2002. Виготовлений препарат був нешкідливим.

Залишкову кількість перекису водню в вакцині визначали перманганатметричним способом, концентрація якого в готовому препараті не перевищувала 0,1%.

Залишкову кількість формальдегіду в вакцині визначали за кількістю формальдегіду в досліджуваній пробі, концентрація якого в готовому препараті не перевищувала 0,1%.

Імуногенність серії вакцини перевіряли на 80 білих мишах. Вакцину вводили 40-м мишам підшкірно дворазово з інтервалом 14 діб у дозі  $0,5 \text{ см}^3$ . Інших 40 мишей (контрольна група), які залишились, не вакцинували.

Через 14 діб після другого введення вакцини всіх щеплених мишей розділяли на 4 групи по 10 голів у кожній групі, тварин відповідно заражали внутрішньочеревно добовими бульйонними культурами контрольних штамів *E.coli* серовару O8 (№11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та *P.vulgaris* (№ 5) у дозі 4 ЛД<sub>50</sub> в  $0,5 \text{ см}^3$ .

Не щеплених мишей (контрольні) також розділяли на 4 групи по 10 тварин в кожній і заражали інтраперітоніально культурами контрольних штамів, а саме: *E. coli* серовару O8 (№ 11), *P.multocida* серовару D (№ 3), *S.pneumonia* (№ 22) та

*P.vulgaris* (№ 5) у дозі 4 ЛД<sub>50</sub> в  $0,5 \text{ см}^3$ . За піддослідними тваринами вели спостереження протягом 10 діб, обліковуючи випадки загибелі тварин. Вакцина інактивована асоційована проти респіраторних захворювань телят, забезпечувала захист 100,0 % щеплених мишей (при 100,0 % летальності у мишей контрольних груп).

Імуногенну активність вакцини потрібно також досліджувати додатково на цільових видах тварин (телятах).

Антигенність серії вакцини перевіряли на 40 білих мишах: 20-ти піддослідним тваринам вакцину вводили підшкірно дворазово з інтервалом 14 діб у дозі  $0,5 \text{ см}^3$ . Інших 20 мишей, які залишили, не вакцинували. Через 14 діб після другого введення вакцини у мишей відбирали кров і проводили постановку реакції аглютинації з антигеном (об'єднані інактивовані суспензії бактерій без додавання ад'юванту). Серію вакцини вважали антигенною, якщо у щеплених тварин виявляли рівень антитіл в титрі не нижчі  $4,5 \log_2$ .

Реактогенну властивість серії вакцини перевіряли на 20 телятах віком 0-2 місяців. Піддослідним тваринам вакцину вводили підшкірно (в області шиї) у дозі  $2,0 \text{ см}^3$ . Протягом трьох днів враховували температурну реакцію, загальний стан та місцеву реакцію у піддослідних тварин. Наявність підвищення температури в момент огляду від  $40,0^\circ$  до  $40,5^\circ\text{C}$  розцінювали як слабку, підйом температури від  $40,6^\circ$  до  $41,1^\circ\text{C}$  - середню, від  $41,2^\circ\text{C}$  і вище - сильну загальну реакцію. Гіперемія шкіри без інфільтрату на місці введення і запальний інфільтрат діаметром до 2,0 см розцінювали як слабку, інфільтрат діаметром від 2,1 до 5,0 см інтерпретували як середню, інфільтрат більше ніж 5,1 см в діаметрі або наявність лімфаденіту і лімфангіту вважали за сильну місцеву реакцію. Серію вакцини вважали малореактогенною, якщо середні температурні реакції були знайдені не більш ніж в 7,0 % або тільки середні температурні й місцеві реакції виявлялися не більше ніж в 12,0 % випадків. Прояву сильних реакцій не повинно бути.