



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63248 (13) U
(51) МПК
C12N 1/14 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ СИБІРКИ ТВАРИН

1

2

(21) u201014697

(22) 08.12.2010

(24) 10.10.2011

(46) 10.10.2011, Бюл.№ 19, 2011 р.

(72) СКРИПНИК ВАЛЕРІЙ ГРИГОРОВИЧ, СКРИПНИК АРТЕМ ВАЛЕРІЙОВИЧ, КОЛЕСНИКОВА КАТЕРИНА ЮРІЇВНА

(73) СКРИПНИК ВАЛЕРІЙ ГРИГОРОВИЧ, СКРИПНИК АРТЕМ ВАЛЕРІЙОВИЧ, КОЛЕСНИКОВА КАТЕРИНА ЮРІЇВНА

(57) Спосіб виготовлення вакцини проти сибірки тварин, що включає виготовлення поживного середовища, виготовлення матриксної культури, контролю матриксної культури, посіву матриксної культури на живильне середовище, визначення

контамінації й типовості бактеріального росту та ступеня спороутворення, змивання спор і отримання спорової бактеріальної маси, визначення контамінації й числа живих спор в 1 см³ бактеріальної маси, змішування спорової бактеріальної маси з розчином гліцерину, фасування рідкої вакцини у флакони, укупорювання, маркування, контролювання вакцини, який **відрізняється** тим, що як антиген використовують виробничий штам UA07, а як поживне середовище використовують гідролізат морепродуктів або перевар Хоттінгера, та використовують розчин гліцерину, що виготовлений на фосфатно-буферному розчині з додаванням інгредієнтів за оригінальною рецептурою.

Корисна модель належить до ветеринарної біотехнології, а саме до ветеринарної мікробіології і біотехнології, зокрема до способів виготовлення вакцин для профілактики сибірки тварин. Задача корисної моделі - виготовлення вакцини, яка має високу імуногенну активність, є нешкідливою і може забезпечити високий рівень захисту тварин від збудника сибірки - *Bacillus anthracis*. Дана задача вирішується тим, що вакцина містить живі спори збудника, які при введенні в організм тварини у концентрації $8-12 \times 10^6$ в 1 см³ здатні викликати напружений імунітет.

На сьогодні відомі декілька вакцин проти сибірки тварин [патенти Російської федерації RU 2095409 C1, RU 2220742 C2, а також вітчизняні вакцини - UA 58093 A, UA 46896 U]. Недоліком даних вакцин є те, що вони передбачають застосування для щеплення тварин живі спори у концентрації $20-25 \times 10^6$, в той же час для щеплення тварин у країнах Євросоюзу використовують більш імуногенні вакцини, здатні викликати напружений імунітет у концентрації $2-10 \times 10^6$ в 1 см³ [1].

Прототипом вакцини, що пропонується, може бути вакцина СТІ, виготовлена, як описано в довіднику "Ветеринарные препараты" [2], або "Вакци-

на жива проти сибірки тварин із штаму К-79Z" [реєстраційне посвідчення №1036-04-0162-05 від 07.06.2005 р.]

Технологічні етапи виготовлення вакцини із штаму К-79Z включають в себе:

1. Приготування поживних середовищ.
2. Приготування матриксної культури виробничого штаму:
 - приготування матриксної культури;
 - контроль матриксної культури.
3. Одержання спорової суспензії штаму:
 - посів матриксної культури на тверде живильне середовище;
 - визначення контамінації й типовості бактеріального росту та ступеня спороутворення;
 - змивання спор і отримання спорової суспензії;
 - визначення контамінації й числа живих спор в 1 см³ бактеріальної маси.
4. Виготовлення стимулятора імунітету (екстрацелюлярного токсину):
 - вирощування виробничого штаму у рідкому середовищі;
 - центрифугування отриманої суспензії;

(19) UA (11) 63248 (13) U

- фільтрація надосаду через стерилізуючі фільтри;
- визначення концентрації екстрацелюлярного токсину.

5. Виготовлення 30 ± 3 % розчину гліцерину:

- виготовлення 30 ± 3 % розчину гліцерину;
- стерилізація отриманого розчину.

6. Виготовлення рідкої вакцини:

- змішування спорової суспензії з екстрацелюлярним токсином та розчином гліцерину;
- перевірка контамінації й числа живих спор в 1 см^3 вакцини;
- перевірка концентрації водневих іонів (pH);
- перевірка відсоткового вмісту гліцерину у вакцині;
- фасування рідкої вакцини у флакони;
- укупорювання, маркування, контролювання вакцини.

Технологія виготовлення вакцини "Антравак" аналогічна прототипу, але відрізняється від неї використанням як поживного середовища гідролізату морепродуктів, відсутністю етапу 4 - виготовлення стимулятора імунітету (екстрацелюлярного токсину) та використанням виготовленого за оригінальним прописом фосфатно-буферного розчину для приготування розчину гліцерину.

Приклад 1.

Процес виготовлення вакцини "Антравак" включає в себе наступні операції: виготовлення поживного середовища з гідролізату морепродуктів або перевару Хоттінгера, виготовлення матриксної культури з виробничого штаму UA07, контроль матриксної культури, посів матриксної культури на живильне середовище, визначення контамінації й типовості бактеріального росту та ступеня спороутворення, змивання спор і отримання спорової суспензії, визначення контамінації й числа живих спор в 1 см^3 спорової суспензії, змішування спорової суспензії з розчином гліцерину, що виготовлений на фосфатно-буферному розчині з додаванням інгредієнтів за оригінальною рецептурою, фасування рідкої вакцини у флакони, укупорювання, маркування, контролювання вакцини.

Для виготовлення поживного середовища гідролізат морепродуктів або перевар Хоттінгера розводять дистильованою водою до вмісту 110 ± 10 мг % загального азоту, готують поживний бульйон і асептично вносять в нього на 10 см^3 середовища $1 \pm 0,5 \text{ см}^3$ культури UA07 та інкубують за температури 36 ± 1 °C. Після перевірки росту культури на типовість, відсутність контамінації її висівають у скляні бутлі ємністю 3 дм^3 , в яких накатано агар з гідролізату морепродуктів або перевару Хоттінгера, в дозі $20 \pm 5 \text{ см}^3$ та інкубують за температури 34 ± 2 °C впродовж 96 годин. Далі проводять вибірко-вий контроль на ступінь спороутворення. Масова доля спор, які видно в полі зору мікроскопа, повинна бути не менше 80 %. За цієї умови для прискорення процесу спороутворення у марлеві пробки бутлів вводять по 2 см^3 скипидару й знову інкубують за тієї ж температури протягом 24 годин.

У випадках незадовільного спороутворення (менше 80 % спор у полі зору) допускається інкубування бутлів з посівами до введення у пробки

скипидару додатково протягом доби. При спороутворенні більше 90 % спор у полі зору скипидар не застосовують.

Після закінчення інкубування здійснюють контроль типовості росту сибіркової культури, для чого всі бутлі продивляються візуально на чистоту і типовість росту сибіркової культури. Культури повинні мати вигляд сірувато-білих дрібнозернистих колоній з сріблястим відтінком. Бутлі із слизовим ростом сибіркової культури та контаміновані сторонньою мікрофлорою бракують.

Культури штаму UA07 з типовим ростом змивають стерильним фосфатно-буферним розчином з pH=6,8-7,8 з розрахунку $110 \pm 10 \text{ см}^3$ на один бутль. Спорову суспензію зливають з бутлів за допомогою сифону у градуйовані скляні бутлі-змішувачі з розчином гліцерину та бусами на дні, які потім прогрівають на водяній бані за температури 60 ± 10 °C протягом 40 хвилин.

Бутлі із споровою суспензією шутелюють одну годину, після чого із кожного бутля відбирають зразки для контролю. Бутлі з бактеріальною масою у період проведення контролю зберігають за температури (2-10) °C.

Отриману сибіркову спорову суспензію перевіряють:

- на контамінацію і типовість росту;
- на вміст життєздатних спор в 1 см^3 .

Для визначення кількості живих спор із кожного бутля беруть по 5 см^3 суспензії й готують середню пробу. Після ретельного змішування із середнього зразка вісім роблять послідовних десятиразових розведень від 10^{-1} до 10^{-8} , розведення 10^{-7} і 10^{-8} висівають на чашки Петрі з м'ясопептонним агаром (МПА) по 3 чашки на кожне розведення та у м'ясопептонний бульйон (МПБ) у флакони.

Розрахунок числа живих спор здійснюють за формулою:

$$N = \frac{N_7 + N_8}{1,1},$$

де

N_7 - середнє арифметичне число колоній, які виросли в чашках при посіві із розведення 10^{-7} ;

N_8 - середнє арифметичне число колоній, які виросли в чашках при посіві із розведення 10^{-8} ;

1,1 - постійний коефіцієнт.

Після отримання позитивних результатів перевірки на контамінацію й визначення числа живих спор, сибіркову бактеріальну масу переносять у реактор з (30 ± 3 %) розчином гліцерину з pH=6,8-7,8, що виготовлений на фосфатно-буферному розчині з додаванням інгредієнтів за оригінальною рецептурою із розрахунку отримання концентрації $12 \pm 4 \times 10^6$ живих спор в 1 см^3 . Розчин гліцерину готують у такий спосіб: до фосфатно-буферного розчину з pH = 6,8-7,8 додають основний перевар Хоттінгера до 10 % та глюкозу до 1 %, підігрівають до повного розчинення глюкози і додають гліцерин до 30 %. Стерилізують за температури 120 ± 2 °C протягом 1,5 години. Розчин гліцерину, що застосовується для виготовлення рідкої вакцини, може викликати загибель однієї з п'яти білих мишей масою 18-20 г протягом однієї доби при внутрішньочеревному введенні в об'ємі $0,5 \text{ см}^3$.

Отриману у такий спосіб вакцину асептично фасують у флакони, ретельно перемішуючи її за допомогою мішалки при 30-50 об/хв протягом усього процесу фасування для рівномірного розподілення спор.

На флакони з вакциною наносять маркування згідно ДСТУ 4614:2006 "Препарати ветеринарні імунобіологічні. Маркування".

Після цього проводять контроль вакцини за наступними показниками: визначення зовнішнього вигляду та сторонніх домішок, визначення масового вмісту гліцерину, визначення концентрації іонів

водню (pH), контамінація сторонньою мікрофлорою, типовість росту і однорідність культури, кількість живих спор, масова доля спор, капсулоутворення, нешкідливість, залишкова вірулентність, імуногенність.

Приклад 2.

Перевіряють показники якості комерційної вакцини живої проти сибірки тварин із штаму K-79Z, виробництва Херсонського державного підприємства - біологічна фабрика та вакцини "Антравак" нашого виготовлення. Отримані результати представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Показник	Результати контролю								
	Вакцина жива проти сибірки із штаму K-79Z серій					Вакцина "Антравак" серій			
	Норма за ТУУ	1	2	3		Норма за ТУУ	1	2	3
pH	6,8-7,8	7,7	7,7	7,7		6,8-7,8	7,4	7,3	7,5
Типовість росту	Сірувато-білі колонії в R-формі	+	+	+		Сірувато-білі колонії в R-формі	+	+	+
Однорідність культури	Типові Грам+ палички без інволюційних форм	2 % інв.	3 % інв.	2 % інв.		Типові Грам+ палички без інволюційних форм	+	+	+
Масова частка спор (%)	80-95	93	95	90		95±5	95	90	95
Кількість живих спор в 1 см ³ (10 ⁶)	20-25	21	23	23		12±4	12	10	11
Капсулоутворення	Безкапсульні палички	+	+	+		Безкапсульні палички	+	+	+
Нешкідливість (доза введення 100-125 × 10 ⁶ спор)	Кролі живі, без набряків і некрозів в місці введення	+	+	+		Кролі живі, без набряків і некрозів в місці введення	+	+	+
Залишкова вірулентність (доза введення 10-12,5 × 10 ⁶ спор)	Не повинна викликати набряку, некрозу шкіри. Допускається загибель 1-2 тварин	8* /1**	9* /3**	8* /2**		Не повинна викликати набряку, некрозу шкіри. Не допускається загибель тварин	+	+	+
Імуногенність	Повинно вижити не менше 80 % щеплених морських свинок і загинути всі контрольні, або вижити всі щеплені і загинути не менше 80 % контрольних	8/10	9/10	9/10		Повинно вижити не менше 80 % щеплених морських свинок і загинути всі контрольні, або вижити всі щеплені і загинути не менше 80 % контрольних	9/10	8/10	10/10

Примітка: * - набряки в місці введення; ** - некрози в місці введення.

Як видно із таблиці 1, за більшістю показників якості комерційна вакцина і вакцина, розроблена нами аналогічні. В той же час запропонована вакцина "Антравак", що виробляється зі штаму UA07, має значно нижчу залишкову вірулентність (не викликає набряку, некрозу шкіри і, що вкрай важливо, не допускає загибелі тварин) і в дозі, у двічі меншій, ніж у комерційної вакцини забезпечує імунний захист у 80-100 % випадків.

Приклад 3.

Дослідними і комерційними серіями вакцини імунізували по 2 групи морських свинок вагою 400-450 грам. Вакцини вводили згідно настанов по застосуванню. Через 14 дб тваринам вводили патогенну культуру 2-ї вакцини Ценковського в

дозі 1±0,2 × 10⁶ спор підшкірно в ділянці живота в об'ємі 0,5±0,05 см³.

Вакцина жива проти сибірки із штаму K-79Z повинна містити не менше ніж 20-25 × 10⁶ см життєздатних спор. Таку вакцину вводять морським свинкам в об'ємі 0,5 см³. Таким чином для щеплення морським свинкам необхідно ввести по 10-12,5 см³ × 10⁶ см³ життєздатних спор вакцини.

Запропонована вакцина повинна містити в 1 см³ не більше 12±4 × 10⁶ см³ життєздатних спор. І доза щеплення в об'ємі 0,5 см³ складає не більше 6±2 × 10⁶ см³ життєздатних спор.

Облік результатів проводили через 10 дб після зараження. Результати дослідів наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Визначення імуногенності вакцин

Вакцина	Серія	Доза щеплення ($\times 10^6 \text{ см}^3$ спор)	Кількість тварин				
			щеплено (гол.)	заражено (гол.)	із кількості заражених (гол.)		% захис- ту
					захворіло	не захворіло	
Із штаму K-79Z	1	10-12,5	10	10	2	8	80
Із штаму K-79Z	2	10-12,5	10	10	1	9	90
Із штаму K-79Z	3	10-12,5	10	10	1	9	90
«Антра-вак»	1	5-6	10	10	0	10	100
«Антра-вак»	2	5-6	10	10	2	8	80
«Антра-вак»	3	5-6	10	10	1	9	90
Не вакциновані (контрольні)				10	10	0	0

Дані, представлені в таблиці 2, свідчать, що щеплення морських свинок запропонованою вакциною в дозі $5-6 \times 10^6 \text{ см}^3$ життєздатних спор викликає у 80-100 % випадків несприйнятливості до зараження патогенною культурою 2-ї вакцини Ценковського. Комерційна вакцина дає захист на рівні 80-90 %. Крім того зменшення дози щеплення запропонованої вакцини в 2 рази значно полегшує перебіг поствакцинального періоду у тварин та полегшує проведення обробок ветеринарним спеціалістам.

Джерела інформації:

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010. Chapter 2.1.1.- Anthrax.

2. Ветеринарные препараты. Справочник / Под ред. Д.Ф. Осидзе. - М.: Колос, 1981. - С. 163-168.

3. Деклараційний патент на винахід № 58093 Спосіб виготовлення вакцини проти сибірки / С.А.

Ничик, С.П. Мірошник, Л.М. Іванова та ін.// №58093. - заявл.30.09.2002, опубл. 15.07.2003. - Бюл. № 7.-4 с.

4. Патент України на корисну модель № 46896 Спосіб виготовлення вакцини живої спорової проти сибірки тварин концентрованої / В.М. Дзюба, В.В. Доценко, С.П. Мірошник та ін. // № 46896.- заявл. 13.07.2010, опубл. 11.01.2010. - Бюл. № 1.-6 с.

5. Патент на изобретение RU № 2220742C2 Комбинированная вакцина против сибирской язвы животных / Е.В. Пименов, Е.С. Воронин, В.М. Котляров и др.// RU № 2220742C2, заявл. 26.12.2001, опубл. 10.01 2004.

6. Патент на изобретение RU № 2095409C1 Спосіб виготовлення вакцини против сибирской язвы животных / В.А. Гаврилов, Ю.В. Числов, Л.Ф. Николайчук // RU № 2095409C1. - заявл. 27.06.1995, опубл. 10.11.1997.