



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17912 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 35/74 (2006.01)
A61K 39/116

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЛІВАЛЕНТНОЇ АУТОВАКЦИНИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

(21) u200604499
(22) 21.04.2006
(24) 16.10.2006
(46) 16.10.2006, Бюл. №10, 2006р.
(72) Савченко Борис Іванович, Скрипченко Георгій Степанович, Савченко Юрій Борисович, Осадченко Галіна Аполінаріївна
(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА
(57) Спосіб одержання полівалентної аутовакцини для лікування гнійно-септичних захворювань, що полягає у відборі патогенного матеріалу від хворої людини, ізоляції та ідентифікації мікроорганізмів, нарощуванні бактерійної маси та її знезаражуван-

2

ня, який відрізняється тим, що додатково до складу вакцини вводять культуру бактерій *Klebsiella pneumoniae* spp., при цьому кожную ізольовану культуру бактерій із патогенного матеріалу хворого, а також культуру бактерій *Klebsiella pneumoniae* spp. вирощують окремо одна від одної, осадки культур, після відмивки їх фізіологічним розчином, обробляють гідролізованим риbachим жиром (фармпрепарат "Ектерицид"), витримують 3-5 діб при температурі 37°C, після чого всі одержані антигени об'єднують у рівних об'ємах у полівалентну вакцину та додатково термостатують протягом доби за тих же умов.

Корисна модель належить до медицини, а саме до мікробіології та імунології, може використовуватися для лікування спричинених антибіотикорезистентними грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами, гострих та хронічних захворювань сечостатевої чоловічих та жіночих органів, гнійничкових захворювань шкіри (*Aspergillus vulgaris*), а також для проведення імуномодуючої терапії хворим гнійничковою хірургічною інфекцією, та для профілактики гнійно-септичних ускладнень у породіллі. Корисна модель, також може знайти застосування у ветеринарії при виготовленні вакцин.

В імунології для попередження багатьох інфекційних бактерійних інфекцій широко використовують вакцини, які готують на основі музейних культур. Широке використання у лікувальній практиці антибіотиків та сульфаніламідних препаратів призвело до появи значної кількості резистентних до цих препаратів мікроорганізмів, що відрізняє їх від музейних, прототипних штамів. На цьому тлі значне розповсюдження отримали захворювання, які спричиняються антибіотикорезистентними мікробами кокової групи та умовно-патогенними грамнегативними мікроорганізмами. Тому лікування захворювань на основі вакцин, одержаних з ізо-

льованих від хворої людини мікроорганізмів, є актуальною проблемою [1-4].

Є відомими способи одержання вакцин на основі антигенів музейних штамів мікроорганізмів та їх подальшого знешкодження високотемпературною обробкою біомаси мікроорганізмів або обробкою збудників хімічними речовинами [5]. У разі високотемпературної обробки мікроорганізмів, поряд з їх знешкодженням, виникає значна зміна антигенних властивостей, що пов'язана з тепловою денатурацією білкових антигенів. При хімічному знешкодженні вакцин, наприклад, фенолом, крім того, що сама хімічна речовина має токсичну дію по відношенню до макроорганізму, вакцини залишаються корпускулярними, тобто неподрібненими. При цьому утворюються як специфічні, так і неспецифічні глобуліни. Наявність неспецифічних антигенів веде до накопичення неспецифічних імуноглобулінів, які не захищають макроорганізм від вторгнення мікроорганізмів значною мірою змінених щодо чутливості до антибіотиків.

Також є відомим спосіб одержання стерильного індивідуального матеріалу (аутовакцина) "СИ-АМ" [патент РФ №2095073], яку використовують для лікування хронічних простатитів, спричинених мікрофлорою [6]. Препарат використовують для лікування простатитів, спричинених бактеріальною

(19) UA (11) 17912 (13) U

мікрофлорою. Він заснований на ізоляції чистих культур мікроорганізмів, відборі вірулентних колоній, вирощуванні культури на чашках з целофаном, змиві з чашок культури апірогенною дистильованою водою, титруванні суспензії відповідно до стандарту мутності (ГІСК ім. Л.А.Тарасевича) до 2млрд. в 1,0мл, інактивації патогенного матеріалу кип'ятінням впродовж 45-60 хвилин при +100-110°C, розливі індивідуального антигенного матеріалу в ампули. Препарат вводять комбіновано, паралельно в шкіру та у м'язи по 0,5мл через 1-3 дні дозою 2млрд. мікробних клітин в 1мл, курсом 5 одномоментних ін'єкцій. Цей спосіб був обраний прототипом.

Зазначений спосіб характеризується такими недоліками:

- антигени мікроорганізмів піддають тривалому кип'ятінню, внаслідок чого змінюються антигенні властивості, а це суттєво знижує імуногенну активність аутовакцини;

- введення одержаного препарату здійснюють без визначення можливої алергічної дії на введення препарату.

У зв'язку з цим в основу способу одержання полівалентної аутовакцини для лікування гнійно-септичних захворювань поставлена задача підвищення імуногенних та імуномодуючих властивостей вакцини введенням до її складу додатково речовин біологічного походження, що виконують роль ад'ювантів, та поряд з цим не призводять до руйнування антигенів.

Поставлена задача досягається тим, що запропонований нами спосіб одержання полівалентної аутовакцини для лікування гнійно-септичних захворювань полягає у відборі патогенного матеріалу від хворої людини, ізоляції та ідентифікації мікроорганізмів, нарощуванні бактерійної маси та її знезаражування. Додатково до складу вакцини вводять культуру бактерій *Klebsiella pneumoniae* spp. Осади кожної ізолюваної культури бактерій із одержаного патогенного матеріалу від хворого та окремо вирощеної культури *Klebsiella pneumoniae* spp. відмивають фізіологічним розчином. Кожну культуру окремо обробляють гідролізованим риб'ячим жиром (фармпрепаратом „Ектеріцид”), витримують 3-5 діб при 37°C, потім всі одержані антигени об'єднують у рівних об'ємах у полівалентну вакцину та додатково термостатують протягом доби при 37°C.

Полівалентну вакцину готують наступним чином. Відбирають патогенний матеріал у хворих:

- з гострою або хронічною інфекцією верхніх дихальних шляхів;
- з гнійників шкіри (фурункули, карбункули, гнійничкові висипання *Acne vulgaris*);
- із слизових оболонок людини при захворюваннях сечостатевої системи чоловіків та жінок;
- із гнійних уражень шкіри та ран після хірургічного втручання.

Матеріал від хворого одержують за допомогою стерильних бавовняних тампонів. Тампони поміщають у пробірки з стерильним глюкозним бульйоном та розміщують у термостат при +37°C на 24 години. Роблять посіви на агарові диференціальні середовища (кров'яний агар, сере-

довище Ендо, сольовий агар, живильний агар), вирощують посіви впродовж 24 годин при +37°C. Відбирають колонії характерні для коків, грамнегативних мікроорганізмів, готують мазки з колоній, фіксують матеріал на предметному склі, забарвлюють по Граму. Колонії характерні для патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів відсівають на живильний бульйон та після витримки впродовж 24 годин у термостаті при +37°C висівають на щільний живильний агар, та на щільне живильне середовище для визначення чутливості до антибіотиків, культури знову вирощують 24 години при +37°C. Окремо, за тих же умов, вирощують культуру бактерій *Klebsiella pneumoniae* spp.

Газони кожної зростаючої культури із патогенного матеріалу та бактерій *Klebsiella pneumoniae* spp. змивали 5,0-7,0мл забуференого стерильного фізіологічного розчину (рН 7,2-7,4) у пробірки. Відповідно до стандарту мутності (ГІСК) концентрацію мікроорганізмів фізіологічним розчином доводили до 10⁷ мікробних клітин в 1,0мл. Відбирали по 5,0-7,0мл кожної суспензії в окремі пробірки. Суспензії мікроорганізмів центрифугували при 2,5-3,0тис./хв. 15 хвилин. Окремо до кожного осаду мікроорганізмів приливали 5,0-7,0мл гідролізованого риб'ячого жиру (ектеріциду). Біологічну речовину ектеріцид використовували для інактивації мікроорганізмів та їх токсинів [Ектеріцид - виробник ЗАТ "Біолік", м.Харків, Помірки, наказ МОЗ України від 11.12.2001р.№495].

Суспензії кожного мікроорганізму, включаючи суспензію *Klebsiella pneumoniae* spp., з доданням до суспензій ектеріцидом, в окремих пробірках, розміщували у термостат на 3 доби при +37°C, кожної доби струшували, контролювали стерильність. Через 3 доби стерильні суспензії об'єднували в одній ємності у рівних об'ємах, знову розміщували в термостат на одну добу, контролювали стерильність. Стерильну полівалентну вакцину вносили в ампули по 1,0мл, запаювали, контролювали цілість ампул, підписували та використовували за призначенням.

Імуногенну активність полівалентної вакцини вивчали на 2-х групах білих щурів (по 10 тваринок в кожній). В першій групі (дослідній) на білих щурах досліджували імуногенну активність полівалентної вакцини за накопиченням антитіл проти *Staphylococcus aureus* та *Streptococcus gr.D-Str.faecalis*, а також до ад'юванту *Klebsiella pneumoniae*, обробленого ектеріцидом. Вакцину в об'ємі 5,0мл на одну ін'єкцію вводили двічі з однотижневим інтервалом внутрішньочеревним методом. Паралельно другій (контрольній) групі білих щурів вводили антигени, до яких у якості ад'юванту додавали культуру *Escherichia coli*, також оброблену ектеріцидом. Через 10 діб після введення вакцини, щурів під етером забивали, відбирали кров та оглядали внутрішні паренхіматозні органи, лімфатичні вузли.

Визначення рівня антитіл проводили у об'ємній реакції аглютинації. У якості антигенів використовували культури, що брали для імунізації. Культуру *Klebsiella pneumoniae* перед постановкою реакції аглютинації прогрівали при +100°C 15 хвилин. Рівень специфічних аглютинуючих антитіл у

сироватках крові білих щурів до антигенів *Staphylococcus aureus*, та *Streptococcus gr.D-Str.faecalis*, та до ад'ювантів *Klebsiella pneumoniae*,

Escherichiae coli, отриманих при обробці їх ектерицидом та об'єднаних у полівалентні антигени наведено у Таблиці 1.

Таблиця 1

Титри антитіл у сироватках крові імунізованих білих щурів

Титри антитіл до				Титри антитіл до			
гр.1 №№ щурів	Staph. aureus + Kl. pneum.	St.gr.D-Str.faecalis + Kl.pneum.	Kl.pneum.	гр.2 №№ щурів	Staph. aureus	St.gr.D-Str.faecalis	E.coli
1	1:640	1:640	1:640	1	1:160	1:80	1:80
2	1:320	1:320	1:640	2	1:320	1:80	1:160
3	1:160	1:160	1:320	3	1:80	1:80	1:80
4	1:640	1:640	1:640	4	1:40	1:40	1:40
5	1:80	1:80	1:160	5	1:160	1:160	1:160
6	1:320	1:640	1:640	6	1:160	1:80	1:160
7	1:320	1:320	1:320	7	1:80	1:40	1:80
8	1:320	1:320	1:320	8	1:80	1:40	1:80
9	1:160	1:160	1:160	9	1:160	1:80	1:160
10	1:160	1:160	1:320	10	1:160	1:80	1:80
Середньо геометричні титри							
	367,6	259,9	367,6		121,3	69,6	98,5
Інтервальні величини							
	від 248,5 до 543,8	від 162,3 до 416,3	від 248,5 до 543,8		від 79,8 до 184,3	від 50,9 до 95,3	від 70,4 до 137,7

Середньгеометричні титри антитіл до *Staph. aureus* та *St.gr.D- Str.faecalis* з високою ступінню достовірності ($p < 0,01$) були вищими у групі тварин імунізованими з використанням в якості ад'юванту культуру мікроорганізмів *Klebsiella pneumoniae*. Рівень середньо геометричних антитіл до ад'юванту *Klebsiella pneumoniae* також був значно вищим від рівня антитіл до *E.coli*.

Таким чином, внутрішньочеревне введення білим щурам полівалентного антигену з включенням культури мікроорганізму *Kl.pneumonia* в якості ад'юванту, обробленого ектерицидом, веде до накопичення антитіл у більш високих титрах до кожного антигену в порівнянні з використанням в якості ад'юванту культури *E.coli*.

Одержану полівалентну аутовакцину з культурами мікроорганізмів *Kl.pneumon.* та *E.coli* перевіряли на реактогенність та на токсичність на біологічних тваринах (білих мишах та білих щурах). Білим мишам полівалентну вакцину вводили підшкірно внутрішньої поверхні задніх лапок зростаючі дози вакцини, починаючи з 0,1мл., кожні 3 доби дозу збільшували на 0,1мл до 1,0мл. За весь час спостереження (3 тижні) експериментальні тварини залишалися здоровими, інфільтратів, набрякання, почервоніння шкіри не спостерігали. Білим щурам вакцину вводили дворазове по 5,0мл. внутрішньочеревним методом. При розтині заморених етером мишей та білих щурів паренхіматозні органи та лімфатичні вузли залишалися без зміни. Це свідчить про те, що токсини культур *Staphylococcus aureus* та *Klebsiella pneumoniae*, оброблені ектерицидом за 3 доби (при $t=37^{\circ}\text{C}$) перетворювалися в анатоксини та мали високу імуногенну активність.

Підвищення імуногенної дії та імуномодуючих властивостей запропонованої полівалентної аутовакцини за рахунок включення *Kl.pneumonia* та обробки всіх складових антигенів гідролізованим рибацьким жиром (ектерицидом) пояснюються наступним чином:

- Стінки клітин грампозитивних мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. *Streptococcus gr.D- Str. faecalis* (Ентерокок) мають у своєму складі мурамідіпептиди (МДП) [7,8], яким притаманна імуномодуюча активність.

- Наявність у *Staphylococcus aureus* ентеротоксинів (які за умов м'якого гідролізу ектерицидом перетворилися у анатоксини) навіть у незначній концентрації активно діють на імунну систему макроорганізму, викликають активацію Т-лімфоцитів до 15%, стимулюють проліферацію лімфоцитів [3].

- Наявність у складі полівалентної вакцини грамнегативних мікроорганізмів, наприклад *Klebsiella pneumoniae*, що мають у своєму складі ліпополісахариди (ЛПС з ліпідами А) забезпечує імуностимулюючу активність. ЛПС в поєднанні з ліпідами ектерициду мають ад'ювантну та біостимулюючу властивість.

- Об'єднання МДП та ЛПС бактерій на ліпідній основі ектерициду має синергійну дію та сприяє стимуляції імунітету швидким утворенням у високих титрах специфічних протимікробних антитіл. Набута ліпофільність сприяє пролонгації депонування речовини в теплокровному макроорганізмі, що також стимулює імуногенез.

З метою стандартизації одержання полівалентної вакцини та визначення терміну інактивації мікроорганізмів нами вивчена бактерицидна активність стандартного фармакопійного препарату ектерициду. Брали свіжоізолювані культури мік-

роорганізмів. Мікроорганізми після їх ідентифікації, висівання на пластинку щільного агарового живильного середовища, термостатували, готували суспензії, центрифугували, відділяли осад. До осаду приливали 5,0-7,0мл. ектерициду. добре розбивали осад у фізіологічному розчині та переносили у бактеріологічну пробірку. Отриману суміш, та необроблені культури (для контролю) поміщали у термостат при +37°C на 5 діб. Кожної доби суміш та не оброблену культуру струшували

для отримання рівномірної суспензії. Відбирали мірною піпеткою 0,5мл. та у двох рядах пробірок готували десятиразові розведення, котрі висівали на пластинку щільного живильного агару. Засіяні розведення культур поміщали у термостат на 24, 48, 72 та 120 годин, а потім проводили підрахунок колоній мікроорганізмів, що вирости. Результати вивчення бактерицидної активності ектерициду у їх відношенні до вивчених культур мікроорганізмів приведені в Таблиці 2.

Таблиця 2

Бактерицидна активність ектерициду

Найменування культур	Титри культур мікроорганізмів у суміші з ектерицидом				
	до обробки	24г	48г	72г	120г
Staph.aureus	7x10 ⁷	5x10 ⁷	2x10 ³	Росту немає	Росту немає
Staph.epidermidis	8x10 ⁷	5x10 ⁶	2x10 ²	Росту немає	Росту немає
Str. Gr. D-Str. faecalis	10x10 ⁷	5x10 ⁵	3x10 ²	Росту немає	Росту немає
Candida albicans	5x10 ⁷	5x10 ⁷	5x10 ⁷	5x10 ⁷	5x10 ⁷
Escherichia coli	10x10 ⁷	5x10 ⁵	5x10 ²	Росту немає	Росту немає
Klebsiella pneumoniae	15x10 ⁷	4x10 ⁴	3x10 ²	Росту немає	Росту немає

Таким чином, встановлено, що ектерицид протягом 3 діб при +37°C знешкоджує грампозитивні мікроорганізми Staphylococcus, Str.group D-Str. faecalis та грамнегативні Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli. Встановлена резистентність до ектерициду, з числа дослідних, лише культури Candida albicans.

Порівняння способу одержання полівалентної аутовакцини з аутовакциною за способом прототипа доводить наявність низки переваг у запропонованого нами рішення:

- розроблена вакцина сприяє підвищеній імуногенності;

- не викликає пошкодження антигену та біохімічне активних речовин, що входять до складу бактеріальних клітин;

- підвищення імунотропності активності через полегшення доступу імунотропних речовин та імуностимуляторів, які знаходяться у бактерійних клітинах до імунотропних клітин людини (макрофагів), веде до швидкого накопичення антигену у високих титрах.

- м'який гідроліз ектерицидом одного із токсичних компонентів ліпополісахариду грамнегативних бактерій - ліпиду А, забезпечує отримання нетоксичного препарату, чим запобігає ендотоксичному шоку при бактерійній інфекції.

Приклади конкретного виконання:

№ № пп	Технологічні етапи приготування полівалентної вакцини	Приклад 1 Хворий П., 42р. Д-з: простатит	Приклад 2 Хвора Л., 37р. Д-з: Ендометрит
1	Відбір проби стерильним тампоном	із слизових сечовидільного каналу	із слизової цервікального каналу
2	Посів проби на агарові диференціально-діагностичні середовища, вирощування 24год. при +37°C	Кров'яний агар Сольовий агар Живильний агар	Середовище Ендо Кров'яний агар
3	Відбір колоній мікроорганізмів, фіксація, окраска по Граму	Характеристика відібраних колоній	Характеристика відібраних колоній
4	Висівання патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а також додатково Kl.pneumoniae на агарові пластинки, отримання моно-шарових культур	Staph.aureus St.gr.D-Str.faecalis	E.coli Staph.aureus St.gr.D-Str.faecalis
5	Змив моношарових культур патогенів з агарових пластинок у пробірки забуференим фізіологічним розчином з рН	7,2	7,4
6	Доведення мікробних клітин у суспензії до стандартної концентрації	10 ⁷	10 ⁷
7	Центрифугування, 15хв., отримання осаду	3,0тис/об	3,5тис/об
8	Додавання до осаду кожної культури мікроорганізмів ектерициду (Ectericides)	5,0мл	7,0мл

№ № пп	Технологічні етапи приготування полівалентної вакцини	Приклад 1 Хворий П., 42р. Д-з: простатит	Приклад 2 Хвора Л., 37р. Д-з: Ендометрит
9	Термостатування пробірок з культурами, обробленими ектерицидом, при +37°C, струшування до отримання завису впродовж культивування	3 доби	5 діб
10	Контроль стерильності	через 3 доби	через 3 доби
11	Об'єднання вмісту усіх пробірок з мікроорганізмами, обробленими ектерицидом		
12	Термостатування одержаної полівакцини при +37°C	1 доба	1 доба
13	Ампулювання, маркування, надання інструкцій щодо введення вакцини	ампули, 1мл - 11шт.	ампули, 1мл-11шт.

Джерела інформації

1. Позняк С.Б., Васильєва Р.С., Третьяков В.К. Аутовакцина при гнойно-воспалительных заболеваниях. // Здоровоохранение Белоруссии, 1980, №8. С.55-57.

2. Ярема И.В., Сипратов В.И., Сильманович Н.Н. Предоперационная иммунопрофилактика // Лечащий врач.- 1998.- №5.

3. Генчиков Л.А., Акатов А.К., Хотенев М.Л. и др. в кн. Стафилококки и внутрибольничная инфекция. - М.: Медгиз, 1975.-125с.

4. Липкин М.Е., Пушкова К.Т. Применение ауто вакцинации для лечения различных хронических заболеваний // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунотерапии. -1969, №10.-С.71-73.

5. Выгодчиков Т.В. Научные основы вакцинно-сывороточного дела. В кн. Руководство по микро-

биологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. - М.: Медгиз. - 1964, том 3, г. С.496-503.

6. Патент РФ №2095073. Способ лечения воспалительных заболеваний урогенитального тракта, вызванных бактериальной микрофлорой / 6 А61К35/74/ Патентообладатели: Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"; Саратовский государственный медицинский университет; Многоотраслевая медицинская фирма "Терапевтическая урология, сексопатология-сервис" . - Дата подачи заявки: 1994.02.25. - Дата публикации: 1997.11.10

7. Калюжин О.В., Фукс Б.Б., Бовин Н.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1994-№5. С.510-513.

8. Козлов Л.В., Ростовцева Л.И., Ломака Т.С. и др. // Биоорг. хим.-1985-№11. -С.1510-1518.