



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76960** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 39/112 (2006.01)
C12N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 07514	(72) Винахідник(и): Обуховська Ольга Валеріївна (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Глебова Катерина Валеріївна (UA), Петренчук Еліна Петрівна (UA), Крюкова Наталя Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.01.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2013, Бюл.№ 2	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ САЛЬМОНЕЛЬОЗУ ПТИЦІ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу птиці включає накопичення бактеріальної маси виробничого штаму, інактивацію, стандартизацію. Як виробничий штам використовують *Salmonella Enteritidis* M, як ад'ювант - Montanide ISA 70. Накопичують бактеріальну масу виробничого штаму в рідкому поживному середовищі. Як інактиватор застосовують 1 % формалін.

U
UA 76960

Корисна модель належить до ветеринарної імунології та мікробіології, зокрема до способу виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу птиці. Даний спосіб може бути використаний при серійному біофабричному виготовленні вакцини проти сальмонельозу птиці або при виготовленні експериментальних серій вакцини з науковою метою.

Існує спосіб виготовлення живої концентрованої вакцини проти сальмонельозу (Патент № 2124366 РФ, А61К 39/02. Способ изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных и птиц [текст]/ М.Я.Ярцев, В.В. Доценко; № 97116100/13; заявл. 03.10.1997; опубл. 10.01.1999). При цьому сальмонели культивують у поживному середовищі на основі білкового концентрату (СБК), отриману культуру концентрують, розводять захисним середовищем, фасують по флаконах та ліофільно висушують.

Недоліком цього способу є застосування живого штаму сальмонел в складі вакцини. В цьому випадку існує можливість реверсії вірулентних властивостей штаму в польових умовах, що може призвести до спалаху захворювання та погіршення епізоотичної ситуації в групі вакцинованих тварин.

Також існує спосіб виготовлення вакцини інактивованої проти сальмонельозу голубів (Патент №2377015 РФ, А61К 39/112, А61Р 31/04 Вакцина инаktivированная против сальмонеллеза голубей и способ ее применения [текст]/ Н.В. Пименов, № 2008116645/13, заявл. 29.04.2008, опубл. 27.12.2009). Спосіб включає вирощування штамів сальмонел *Salmonella Typhimurium* М-5в t-ДЕП, *Salmonella Typhimurium* Д-1в t-ДЕП та *Salmonella Enteritidis* 25 Яв e-ДЕП на щільному поживному середовищі, інактивацію їх 0,3 %-вим формаліном та осадження поліетиленгліколем та стандартизацію бакмаси сальмонел до фінальної концентрації 2 млрд. мкр. кл. в 1 см³ препарату. Доза вакцини становить 0,5 см.

Недоліком цього способу є остаточна кількість поліетиленгліколю, яка залишається у препараті, при цьому ПЕГ об'єднується із пептидними структурами сальмонел, що призводить до їх фармакологічної модифікації та знижує імуногенні властивості вакцини.

Найбільш близьким за технічною суттю можна вважати спосіб виготовлення вакцини «АВИВАК-Сальмовак» (Рождественская, Т.Н. Создание комплексной системы профилактики бактериальных болезней птиц в хозяйствах промышленного типа [Текст]: Автореф. Дис. докт. вет. наук: 06.02.02 / Т.Н. Рождественская [ГНУ «ВНИВИП»]. - СПб., 2011. - 53 с.).

Для виготовлення вакцини застосовують штам *Salmonella Enteritidis* "С-5-АТ", який накопичують на щільному поживному середовищі, бак масу стандартизують та сорбують на 3 %-ому гелі гідроокису алюмінію (ГОА) в співвідношенні 1:1. Це рішення може бути прототипом.

Недоліком способу є використання як ад'юванту гелю гідроокису алюмінію, який має побічну нейротоксичну дію на організм тварини.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу птиці, що включає накопичення бактеріальної маси виробничого штаму, інактивацію, стандартизацію шляхом використання як виробничого штаму *Salmonella Enteritidis* М, як ад'юванту Montanide ISA 70, накопичення бактеріальної маси виробничого штаму на рідкому поживному середовищі, проведення інактивації 1 % формаліном, щоб забезпечити ефективність способу.

Ефективність вакцини, виготовленої за способом, що патентується, базується на високому рівні її імуногенності, що зумовлено унікальними властивостями виробничого штаму *Salmonella Enteritidis* М, та застосуванням масляного ад'юванту Montanide ISA 70, який дозволяє сформувати стабільну емульсію типу вода/масло, що відповідає критерію «новизна». Вакцина виготовлена з інактивованого штаму є нешкідливою при застосуванні в польових умовах. Використання одного штаму для отримання антигенної основи вакцини дозволяє отримати інтенсивну імунну відповідь, що в свою чергу зумовлює високі протективні властивості вакцини.

Спосіб виконується таким чином.

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу птиці включає накопичення бактерійної маси виробничого штаму *Salmonella Enteritidis* М на м'ясо-пептонному бульйоні із додаванням 10 % сироватки ВРХ та 1 % глюкози (режим інкубування 48 год. за температури 37 °С). Отримана бакмаса інактивується шляхом додавання 1 % формаліну (режим інактивації 24 год. за температури 37 °С). Інактивовані клітини сальмонел осаджують шляхом центрифугування та двічі відмивають стерильним фосфатно-сольовим буфером (режим центрифугування 3 тис.об/хв. протягом 20 хв). Осад стандартизують до концентрації 2 × 10 КУО/см³. До суспензії додають Montanide ISA 70. Співвідношення компонентів наступне, до складу вакцини входить 30 % суспензії інактивованих клітин виробничого штаму *Salmonella Enteritidis* М (2 × 10 КУО в одній дозі) на стерильному фосфатно-буферному фізіологічному розчині та 70 % Montanide ISA 70.

Приклад 1.

З метою вивчення імуногенних та протективних властивостей інактивованої вакцини проти сальмонельозу було проведено дослід на курчатах. Було сформовано 2 групи (по 40 гол.) курчат за принципом аналогів.

1 група (дослідна) була імунізована вакциною дворазово в віці 30 та 37 дів (внутрішньом'язово в грудні м'язи, об'єм вакцини 0,3 см³).

2 група (контрольна) залишалась інтактною.

З метою визначення наявності та титру антитіл до *Salmonella Enteritidis*, а також динаміки формування імунітету у птиці всіх груп відбирали проби сироваток крові до імунізації, а також в наступні строки - через 7 дів після першої вакцинації та через 14, 28, 42, 56, 70, 84, 112 та 180 дів після другої вакцинації.

Сироватку крові птиці перевіряли в ПРА із «Антигеном для діагностики сальмонельозів тварин групи Д в реакції аглютинації» (ТУУ 24.4-00497087-105:2010).

Через 14 дів після останнього введення вакцинних препаратів курчата обох груп були інфіковані внутрішньом'язово добовою культурою *Salmonella Enteritidis* М кількістю 2-10⁹ КУО. За птицею вели спостереження протягом 10 дів, враховуючи наявність та інтенсивність прояву клінічних ознак. Після чого курчата усіх груп були примусово забиті шляхом тотального знекровлення, від птиці були відібрані внутрішні органи для проведення бактеріологічних досліджень.

Дослідження показали, що введення вакцини стимулює наробку специфічних антитіл на рівні 8,25 log₂ на 14 добу після другого введення, на 28 добу інтенсивність імунної відповіді підвищується до 8,25 log₂ і стабільно утримується на цьому рівні до 56 доби. Після цього спостерігали незначне зниження титрів в середньому на 0,05 log₂, однак титри були стабільно високими впродовж 180 дів (8,1 log₂).

Протективні властивості вакцини були вивчені в досліді по прямому зараженню птиці. На 14 добу після другого введення вакцин по 20 голів з обох груп птиці були заражені культурою *Salmonella Enteritidis*. За птицею спостерігали протягом 10 дів. На 3-тю добу птиця контрольної групи захворіла із типовими клінічними ознаками гострої сальмонельозної інфекції. Спостерігали пригнічення, відмову від корму, виснажуючу діарею, лихоманку. 13 голів птиці з цієї групи загинули на 5 добу, жива птиця була примусово забита на 10-ту добу спостереження. З крові серця, жовчі, паренхіми селезінки, вмісту сліпих відрізків кишечника та трубчастої кістки від усіх курей контрольної групи було ізольовано культуру *Salmonella Enteritidis*.

У птиці дослідної групи ніяких клінічних ознак не спостерігали. На 10-ту добу спостереження птиця дослідної групи була забита, внутрішні органи піддані бактеріологічним дослідженням. З жовчного міхура однієї особини була ізольована культура *Salmonella Enteritidis*.

Таким чином, запропонований нами спосіб дозволяє отримати вакцину, яка за умов 2-разового внутрішньом'язового введення стимулює напрацювання специфічних антитіл на рівні 8,30±0,06 log₂ і забезпечує захист 95 % імунізованих особин від зараження штамом-пробійником.

Приклад 2.

Вивчення ефективності застосування вакцини було проведено у виробничих умовах. В приватному господарстві було вакциновано фазанів експериментальною серією вакцини. Група птиці з 28 голів віком від 12 до 18 місяців була імунізована вакциною дворазово з інтервалом 7 дів (внутрішньом'язово в грудні м'язи, об'єм вакцини 0,3 см³).

З метою визначення наявності та титру антитіл до *Salmonella Enteritidis*, а також динаміки формування імунітету у птиці всіх груп відбирали проби сироваток крові до імунізації, а також в наступні строки - через 28, 56 та 126 дів після другої вакцинації. Сироватку крові птиці перевіряли в ПРА із «Антигеном для діагностики сальмонельозів тварин групи Д в реакції аглютинації» (ТУУ 24.4-00497087-105:2010). Дослідження показали, що введення вакцини стимулює наробку специфічних антитіл на рівні 8,5 log₂ на 28 добу після другого введення, на 56 добу інтенсивність імунної відповіді залишилась на тому ж рівні. На 126 добу виявили незначне зниження рівня імунної відповіді (до 8,00 log₂). Впродовж усього строку спостереження у птиці не виявили погіршення загального фізіологічного стану. Місцевої реакції на введення препарату не спостерігали.

Таким чином запропонований нами спосіб дозволяє отримати вакцину, яка за умов 2-разового внутрішньом'язового введення стимулює напрацювання специфічних антитіл на рівні в середньому 8,00 log₂, який стабільно зберігається впродовж 180 дів, забезпечує захист 95 % імунізованих особин від зараження штамом-пробійником та не чинить негативного впливу на організм птиці.

Запропонований спосіб знайде широке впровадження в біотехнологічній промисловості або наукових дослідженнях для створення інактивованої вакцини із високими імуногенними та

проективними властивостями для профілактики сальмонельозу продуктивної, племінної або декоративної птиці.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти сальмонельозу птиці, що включає накопичення бактеріальної маси виробничого штаму, інактивацію, стандартизацію, який **відрізняється** тим, що як виробничий штам використовують *Salmonella Enteritidis* M, як ад'ювант - Montanide ISA 70, накопичують бактеріальну масу виробничого штаму в рідкому поживному середовищі, як інактиватор застосовують 1 % формалін.

10

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601