



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76961** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 39/00
C12N 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 07516	(72) Винахідник(и): Обуховська Ольга Валеріївна (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Глебова Катерина Валеріївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.06.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.01.2013	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.01.2013, Бюл.№ 2	

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ІНАКТИВОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ РЕСПІРАТОРНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦІ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці включає накопичення бактеріальної маси, інактивацію, центрифугування, стандартизацію, додавання ад'юванту. Для накопичення бактеріальної маси застосовують «Середовище рідке поживне для ізоляції та культивування мікоплазм від тварин та птиці», як інактиватор - 1 % формалін, та застосовують виробничий штам вакцинною дозою 3×10^7 КУО.

UA 76961 U

Корисна модель належить до ветеринарної імунології та мікробіології, зокрема до способу виготовлення інактивованої вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці.

Існує спосіб виготовлення живої ліофілізованої вакцини з атенуйованого штаму *Mycoplasma gallisepticum* 6/85 (The effect of a live vaccine on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum* [text] / A. Feberwee [et al] // Avian Pathol., 2006. - Vol. 35. - № 5. - P. 359-366). Спосіб включає накопичення бакмаси мікоплазм, стандартизацію клітин на специфічному середовищі (яке містить натрію хлорид, натрію глутамат, сахарозу, панкреатичний гідролізат казеїну, гідролізат лактальбуміну, желатину, натрію гідрофосфату дигідрат, калію дигідрофосфат, натрію дигідрофосфату дигідрат, натрію гідрофосфату дигідрат). Недоліком цього способу є застосування живого штаму мікоплазм у складі вакцини. У цьому випадку існує можливість реверсії вірулентних властивостей штаму в польових умовах, що може призвести до спалаху захворювання та погіршення епізоотичної ситуації в групі вакцинованої птиці. Вакцина також містить велику кількість допоміжних речовин, які можуть призвести до небажаних реакцій організму і знизити інтенсивність імунної відповіді.

Також існує спосіб виготовлення інактивованої вакцини з "місцевих штамів" *M. gallisepticum* (Rozina, A. Evaluation of efficacy of formaldehyde treated *Mycoplasma gallisepticum* vaccine in broiler chicken [text] / A. Rozina, M.A. Khan // Pakistan J. of Scientific and Research., 2002. - Vol. 45. - № 4. - P. 284-290). Спосіб включає накопичення бакмаси місцевих штамів *M. gallisepticum* MI-203 та Mu-21, інактивацію їх шляхом прогрівання, стандартизацію та додавання ад'юванту. Недоліком цього способу є застосування "місцевих штамів", які є нестабільними і можуть втрачати в процесі їх підтримання свої імуногенні властивості, також необхідно враховувати, що такі штами можна застосовувати тільки на певній території (де вони циркулюють), при використанні таких вакцин в інших стадах птиці ефективність вакцинації може бути нульовою. Таким чином, цей спосіб є економічно невиправданим.

Найбільш близьким до рішення, що заявляється, є спосіб виготовлення вакцини "АВИВАК-РМ" (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 *Mycoplasma gallisepticum* S₆, який культивують на середовищі Едварда, накопичують бакмасу мікоплазм на середовищі на основі триптичного гідролізату кільки, стандартизують, інактивують теотропіном та додають як ад'ювант Montanide ISA 70.

Одна доза вакцини містить $1 \times 10^{6,9}$ КУО (колонієутворюючі одиниці) мікоплазм. Це рішення вибрано прототипом. Недоліком прототипу є висока вартість препарату, обумовлена потребою у більшій кількості середовища для отримання бактерійної маси штаму та теотропіну для її інактивації.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці, що включає накопичення бактеріальної маси, інактивацію, центрифугування, стандартизацію, додавання ад'юванту шляхом застосування для накопичення бактеріальної маси "Середовища рідкого поживного для ізоляції та культивування мікоплазм від тварин та птиці", як інактиватор - 1 % формаліну, застосування виробничого штаму вакцинною дозою 3×10^7 КУО, щоб забезпечити ефективність способу.

Ефективність способу, полягає в застосуванні для накопичення мікоплазм "Середовища рідкого поживного для ізоляції та культивування мікоплазм від птиці", що забезпечує високий вихід бактеріальної маси. Обробка мікоплазм формаліном дозволяє досягти повної інактивації збудника, висока концентрація КУО мікоплазм дозволяє зменшити об'єм імунізуючої дози вакцини до $0,3 \text{ см}^3$ (зазвичай використовують дозу $0,5 \text{ см}^3$).

Спосіб виконується таким чином.

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці включає накопичення бактерійної маси виробничого штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆ у "Середовищі рідкому поживному для ізоляції та культивування мікоплазм від тварин та птиці" ТУ У 24.4-00497087-091:2009 (режим інкубації - 5 діб при температурі $37,5^\circ\text{C}$). Отримана бакмаса піддається інактивації шляхом додавання 1 % формаліну (режим інактивації - 2 доби при температурі $37,5^\circ\text{C}$). Інактивована бактерійна маса триразово відмивається стерильним фосфатно-буферним фізіологічним розчином шляхом центрифугування за режимом 5 тис. об./хв. протягом 20 хвилин. Клітинна маса мікоплазм стандартизується стерильним ФБФР до концентрації 1×10^8 КУО/см. До бакмаси додають Montanide ISA 70. Співвідношення компонентів наступне, до складу вакцини входить 30 % суспензії інактивованих клітин виробничого штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆ (3×10^7 КУО в одній дозі) на стерильному фосфатно-буферному фізрозчині та 70 % Montanide ISA 70. Доза вакцини становить $0,3 \text{ см}^3$.

Приклад 1

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

1 група (дослідна) була імунізована вакциною одноразово віком 30 діб (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 *Mycoplasma gallisepticum*, а також динаміки формування імунітету у птиці обох груп відбирали проби сироваток крові до імунізації, а також в наступні строки - через 28, 60, 90 та 180 діб після вакцинації.

Сироватку крові птиці перевіряли в ПРА із антигеном Nobilis MG Antigen (фірми Intervet).

Дослідження показали, що введення вакцини стимулює наробку специфічних антитіл на рівні 3,5 log₂ на 28 добу після імунізації, інтенсивність імунної відповіді стабільно утримується на цьому рівні до 90 доби. Після цього спостерігали незначне зниження титрів у середньому на 0,5 log₂, однак, титри були стабільно високими впродовж 180 діб.

Протективні властивості вакцини були вивчені у досліді з прямого зараження птиці. Через 30 діб після останнього введення вакцини курчата обох груп були інфіковані інтратрахеально та інтраторакально 5-ти добовою культурою *Mycoplasma gallisepticum* S₆ кількістю 2·10⁹ КУО. За птицею вели спостереження впродовж 20 діб, враховуючи наявність та інтенсивність прояву клінічних ознак.

На 14 добу після зараження птиця контрольної групи захворіла із клінічними ознаками ураження респіраторних органів. У птиці дослідної групи ніяких клінічних ознак виявлено не було.

На 21 добу після зараження птиця обох груп була примусово забита. Зі слизової трахеї, легень та головного мозку від усіх курей контрольної групи було ізольовано культуру *Mycoplasma gallisepticum*. Від двох особин з дослідної групи зі слизової трахеї також була ізольована культура *Mycoplasma gallisepticum*, однак ніяких клінічних ознак не виявляли.

Таким чином запропонований нами спосіб дозволяє отримати вакцину, яка за умов 1-разового внутрішньом'язового введення стимулює напрацювання специфічних антитіл на рівні 3,00±0,06 log₂ і забезпечує захист 90 % імунізованих особин від зараження штамом-пробійником.

Приклад 2

Вивчення ефективності застосування вакцини було проведено у виробничих умовах. У приватному господарстві було вакциновано курей експериментальною серією вакцини. Група птиці з 38 голів віком 280 діб була імунізована одноразово (внутрішньом'язово в грудні м'язи, об'єм вакцини 0,3 см³).

З метою визначення наявності та титру антитіл до *Mycoplasma gallisepticum*, а також динаміки формування імунітету у птиці відбирали проби сироваток крові до імунізації, а також в наступні строки - через 28, 60, 90 та 180 діб після вакцинації.

Сироватку крові птиці перевіряли в ПРА із антигеном Nobilis MG Antigen (фірми Intervet).

Дослідження показали, що введення вакцини стимулює наробку специфічних антитіл на рівні 3,2 log₂ на 28 добу після імунізації, інтенсивність імунної відповіді стабільно утримується на цьому рівні впродовж 180 діб.

Після введення вакцини у птиці не виявили погіршення загального фізіологічного стану. Також не було відмічено місцевої реакції на введення препарату.

Таким чином запропонований нами спосіб дозволяє отримати вакцину, яка за умов 1-разового внутрішньом'язового введення стимулює напрацювання специфічних антитіл на рівні в середньому 3,2 log₂, який стабільно зберігається впродовж 180 діб, забезпечує захист 90 % імунізованих особин від зараження штамом-пробійником та не чинить негативного впливу на організм птиці.

Даний спосіб може бути використаний при серійному біофабричному виготовленні вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці або при виготовленні експериментальних серій вакцини з науковою метою.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виготовлення інактивованої вакцини проти респіраторного мікоплазмозу птиці, що включає накопичення бактеріальної маси, інактивацію, центрифугування, стандартизацію, додавання ад'юванту, який **відрізняється** тим, що для накопичення бактеріальної маси застосовують "Середовище рідке поживне для ізоляції та культивування мікоплазм від тварин

та птиці", як інактиватор - 1 % формалін, та застосовують виробничий штам вакцинною дозою 3×10^7 КУО.

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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