



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 99020

(13) U

(51) МПК

A61K 39/09 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 13771**

(22) Дата подання заявки: **22.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.05.2015**

(46) Публікація відомостей **12.05.2015, Бюл.№ 9**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Сторчак Юлія Георгіївна (UA),
Кісера Ярослав Васильович (UA)**

(73) Власник(и):

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ
МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМ. С.З.
ГЖИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010 (UA)**

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ПНЕВМОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ ТЕЛЯТ

(57) Реферат:

Спосіб виготовлення вакцини для профілактики пневмокової інфекції телят включає отримання антигенів, інактивацію, внесення ад'юванту. Штам збудника *Streptococcus pneumoniae* виділяють із рідин та органів хворих або загиблих телят із місцевого епізоотичного вогнища, проводять посів на диференційно-діагностичні середовища, ідентифікують та виділяють чисту культуру, використовуючи біопробу, культивують епізоотичний штам у бульйоні Хотінгера, інактивують фізичним методом, витримуючи на водяній бані, додають спиртоводну емульсію прополісу як ад'ювант, змішуючи компоненти. Досліджують на предмет відсутності контамінації бактеріальної та грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613, визначають на лабораторних тваринах імуногенність, фасують та закупорюють.

UA 99020 U

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме до способів виготовлення інактивованих вакцин для специфічної профілактики стрептококової респіраторної інфекції телят, і може бути використана спеціалістами ветеринарної медицини у тваринницьких господарствах з різними формами власності, скерованих на вирощування молодняка, для ефективної боротьби із бронхопневмоніями пневмококової етіології у телят.

Відомі способи виготовлення вакцини проти респіраторних захворювань телят - вакцина "Пневмосан" асоційована інактивована концентрована (патент України на корисну модель № 18331) та інактивована концентрована вакцина "Пневмомастисан" проти пневмоентеритів, ендометритів і маститів тварин (патент України на корисну модель № 12950), які передбачають використання великої кількості антигенів.

До недоліків даних способів виготовлення вакцини відносять значну трудомісткість, витрати часу на виготовлення препарату, окрім того, дані препарати мають відносно високу реактогенність та низьку імуногенність.

Найбільш близьким технічним рішенням по суті до способу, що заявляється, є спосіб виготовлення вакцини, асоційованої проти стрептококозу та стафілококозу великої рогатої худоби (Патент РФ на винахід № 2406532). Спосіб виготовлення вакцини включає відбір уражених органів від загиблої великої рогатої худоби із місцевого епізоотичного вогнища, приготування з них суспензії, посів на діагностичні середовища, виділення чистої культури у м'ясопептонному бульйоні з додаванням глюкози з титром 4-5 млрд. мікробних клітин у 1 см³, інактивацію шляхом внесення формаліну, витримку при температурі 37 °С впродовж 72-96 годин, змішування культур у рівних пропорціях та внесення розчину гідроксид алюмінію кількістю 20 % від об'єму, фасування та закупорювання.

Прототип і заявлене рішення мають спільні суттєві ознаки: включає отримання антигенів, інактивацію та внесення ад'юванту.

Недоліками даного способу виготовлення вакцини є те, що інактивацію проводять за допомогою формаліну та застосовують як ад'ювант гідроксид алюмінію.

Заявлений нами спосіб виготовлення вакцини з місцевого штаму збудника пневмококової інфекції, інактивованої фізичним методом та на основі водно-спиртової емульсії прополісу як ад'ювант для профілактики інфекції, усуває недоліки прототипу і забезпечує економічно вигідне одержання ефективного препарату, що включає в себе оптимальну кількість як спирто- так і водорозчинних біоактивних та стабілізаційних фракцій прополісу, що визначає високу терапевтичну ефективність препарату (до 95-100 %) в порівнянні з прототипом, не викликає алергічних реакцій та одночасно підсилює захисні сили організму, корегуючи імунний статус тварин.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити простий у виконанні спосіб виготовлення вакцини проти пневмококової інфекції телят із місцевого штаму збудника та підвищення специфічної активності вакцини і стимуляції синтезу антитіл за рахунок удосконалення технології її виробництва, ефективний, економічно вигідний, доступний та зручний у застосуванні.

Технічний результат заявленого способу досягають тим, що штам збудника *Streptococcus pneumoniae* виділяють із рідин та органів хворих або загиблих телят із місцевого епізоотичного вогнища, проводять посів на диференційно-діагностичні середовища, ідентифікують та виділяють чисту культуру, використовуючи біопробу, культивують епізоотичний штам у бульйоні Хотінгера з титром 4×10^9 м.к./мл при $t=37^\circ\text{C}$ та pH 7,0-7,8 впродовж 72 годин, інактивують фізичним методом, витримуючи 55-60 хв. на водяній бані при $t=65-70^\circ\text{C}$, додають 4 % спиртоводну емульсію прополісу як ад'ювант, змішуючи компоненти у співвідношенні, %:

Streptococcus pneumoniae 65-75

4 % спиртоводна емульсія

прополісу

25-35,

досліджують на предмет відсутності контамінації бактеріальної та грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613, визначають на лабораторних тваринах імуногенність, фасують та закупорюють. При цьому ад'ювант виготовляють, змішуванням подрібненого прополісу з 70° етиловим спиртом у співвідношенні 1:3, витримуванням у закритому посуді 5-7 днів, періодично струшуючи, фільтруванням та розведенням 1:6 у теплій дистильованій воді.

Технічний результат обумовлений тим, що для виготовлення вакцини використовується концентрована чиста культура інактивованого штаму збудника *Streptococcus pneumoniae* з місцевого епізоотичного вогнища, виділеного із стерильних рідин (спинномозкова рідина, кров), органів (селезінка, шматочки уражених легенів) або інших середовищ (мокрота, задня стінка

носоглотки) організму хворих, або загинув тварин, чим підвищується висока специфічність та імуногенність способу профілактики пневмококової інфекції телят.

Інактивація фізичним методом дозволяє уникнути небажаних наслідків, пов'язаних із застосуванням розчину формаліну.

5 Використання спиртоводної емульсії прополісу як ад'юванту забезпечує протимікробний терапевтичний ефект, активацію специфічних та неспецифічних факторів імунітету: екстракція 70° етиловим спиртом зумовлює інгібуючу дію на мікроорганізми, а спиртоводна емульсія містить стероїди, пептиди, гормони і підвищує захисні сили організму проти інфекції.

10 Завдяки переходу діючих речовин з прополісу в емульсію також досягається протизапальна дія, стимуляція регенеративних процесів в організмі тварин. До складу прополісу входить велика кількість органічних сполук і мінеральних речовин. Протимікробну активність проявляють органічні кислоти, такі як: фірулова, корична, кофейна та бензойна. Імуностимулюючий ефект виявляється завдяки вітамінам, мікроелементам, біологічно активним речовинам.

15 Імунологічна дія складових частин аутовакцини на основі прополісу на організм тварин проявляється у: стимуляції процесу фагоцитозу; збільшенні кількості Т-лімфоцитів; активації гуморальних ланок імунітету.

Отже, запропонований спосіб виготовлення вакцини, який передбачає виділення штаму збудника *Streptococcus pneumoniae* з місцевого епізоотичного вогнища, отримання чистої культури з титром 4×10^9 м.к./мл, інактивацію фізичним методом та додавання 4 % спиртоводної емульсії прополісу як ад'ювант, забезпечує високу ефективність засобу для профілактики пневмококової інфекції у телят.

20 При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення (Способ изготовления вакцины ассоциированной против стрептококкоза и стафилококкоза крупного рогатого скота, патент РФ на винахід № 2406532), що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим: включає отримання антигенів, інактивацію та внесення ад'юванту.

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом ознак недостатня для отримання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб. Технічних рішень, які за сукупністю ознак повністю співпадають із заявленим способом, заявником не виявлено.

30 У патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату тим, що штам збудника *Streptococcus pneumoniae* виділяють із рідин та органів хворих або загинув телят із місцевого епізоотичного вогнища, проводять посів на диференційно-діагностичні середовища, ідентифікують та виділяють чисту культуру, використовуючи біопробу, культивують епізоотичний штам у бульйоні Хотінгера з титром 4×10^9 м.к./мл при $t=37^\circ\text{C}$ та рН 7,0-7,8 впродовж 72 годин, інактивують фізичним методом, витримуючи 55-60 хв. на водяній бані при $t=65-70^\circ\text{C}$, додають 4 % спиртоводну емульсію прополісу як ад'ювант, змішуючи компоненти у співвідношенні, %:

Streptococcus pneumoniae 65-75

4 % спиртово-водна емульсія

прополісу

25-35,

40 досліджують на предмет відсутності контамінації бактеріальної та грибової мікрофлори згідно ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613, визначають на лабораторних тваринах імуногенність, фасують та закупорюють. При цьому ад'ювант виготовляють, змішуванням подрібненого прополісу з 70° етиловим спиртом у співвідношенні 1:3, витриманням у закритому посуді 5-7 днів, періодично струшуючи, фільтруванням та розведенням 1:6 у теплій дистильованій воді.

45 Заявлена корисна модель належить до ветеринарної медицини, а саме до способів виготовлення інактивованих вакцин для специфічної профілактики стрептококової респіраторної інфекції телят, і може бути використана спеціалістами ветеринарної медицини у тваринницьких господарствах з різними формами власності, скерованих на вирощування молодняка, для ефективної боротьби із бронхопневмоніями пневмококової етіології у телят.

50 Спосіб виконували наступним чином:

- У господарствах, в яких встановлені випадки спалаху пневмококової інфекції, із стерильних рідин та органів (спинномозкова рідина, кров, селезінка, шматочки уражених легенів та ін.), а також інших середовищ (мокрота, задня стінка носоглотки) хворих чи загинув телят виділяють штам збудника. Для цього патологічний матеріал слід доставляти у лабораторію не пізніше 4 годин; провести посів на поживне середовище із додаванням сироватки крові та глюкози, або середовище Хотінгера; культивувати культури при рН 7,0-7,8, температурі 37°C упродовж 72 годин; провести ідентифікацію за допомогою реакції набухання капсули (тест Ней-Фельда),

каталазної проби, мікроскопії; тест на чутливість збудника до оптохіну, солей жовчних кислот, а також здатність до ферментації інуліну.

- Чисту культуру отримують, використовуючи біопробу на білих мишах. Для постановки біопробы 18-20 годинні бульйонні культури вводять внутрішньочеревно в дозі 0,5 мл білим мишам масою 14-16 г. та спостерігають упродовж 3-5 діб. Культуру вважають патогенною в разі загибелі інфікованих лабораторних тварин і виділяють із рідини плевральної порожнини або крові серця культури з властивостями, характерними для вихідної культури.

- Епізоотичний штам *Streptococcus pneumoniae* висівають у ємкості з бульйоном Хотінгера та культивують при температурі 37 °C упродовж 72

10 годин. Визначають концентрацію отриманого інокуляту за допомогою денситометра DEN-1. Концентрація бактеріальної суспензії у 4×10^9 м.к./мл відповідає оптичній щільності у 3,33 нм.

- Інактивація проводиться фізичним методом на водяній бані при температурі у 65-70 °C упродовж 55-60 хв.

15 - Додають 4 % спиртоводну емульсію прополісу: попередньо до подрібненого прополісу додають 70 % спирту у співвідношенні 1:3, витримують у закритому посуді 5-7 днів, періодично струшуючи, фільтрують та розводять 1:6 у підігретій дистильованій воді.

Змішують інактивовану бактеріальну суспензію з ад'ювантом у співвідношенні, %:

Streptococcus pneumoniae 65-75

4 % спиртоводна емульсія

прополісу 25-35,

20 - Визначають стерильність вакцини та її нешкідливість. Для цього зразки вакцини досліджують на предмет відсутності контамінації бактеріальної і грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613.

25 - Визначають імуногенність. Для цього 15-20 лабораторним мишам вагою в 14-18 г вводять дворазово профілактичний засіб у дозі 0,3 мл. Через 14 діб після проведення повторного щеплення тварин заражають польовим штамом *Streptococcus pneumoniae* у дозі 0,5 мл. Вакцина вважається нешкідливою у тому випадку, якщо впродовж усього періоду спостереження за дослідними тваринами, більше ніж 70 % білих мишей залишилось живими.

- Фасують готову вакцину та закупорюють.

Ефективність заявленого способу та його переваги перед прототипом підтверджені прикладом конкретного використання.

30 Дослідження по розробці та виготовленню профілактичного засобу проти стрептококової інфекції телят проводились на базі лабораторії бактеріологічного контролю якості та безпечності ветеринарних препаратів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, кафедри епізоотології ЛНУВМ та БТ імені С.З.Гжицького та у КМКЛШМД м. Львова.

35 Інактивацію бактеріальної суспензії проводили фізичним методом. Культуральними та біологічними методами була визначена повнота інактивації вакцинного препарату. Зразки вакцини були досліджені на предмет відсутності контамінації бактеріальної і грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613. У випадку відсутності росту мікроорганізмів на поживних середовищах та ознак захворювання і загибелі імунізованих мишей, дану вакцину вважали повністю інактивованою.

40 Концентрацію інокуляту визначали за допомогою денситометра DEN-1 (Таблиця 1). Інтерпретацію результатів (у вигляді одиниць Мак-Фарланда) здійснювали у відповідні числові значення концентрацій бактеріальних суспензій та їх оптичну щільність при $\lambda = 550$ нм.

Таблиця 1

Концентрацію інокуляту при $\lambda=550$ нм

Стандарти Мак-Фарланда	Склад	Інтерпретація	
	Концентрація BaSO_4	Концентрація бактерій	Теоретична оптична щільність при $\lambda 550$ нм
0,5	$2,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,15 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,125
1	$4,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,3 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,25
2	$9,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л	$0,6 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,5
3	$1,44 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$0,9 \cdot 10^9$ м.к./мл	0,75
4	$1,92 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$1,2 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,0
5	$2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$1,5 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,25
10	$4,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л	$3,0 \cdot 10^9$ м.к./мл	2,5
Дослідна бак. суспензія № 1		$2 \cdot 10^9$ м.к./мл	1,67
Дослідна бак. суспензія № 2		$4 \cdot 10^9$ м.к./мл	3,33
Дослідна бак. суспензія № 3		$6 \cdot 10^9$ м.к./мл	5,0

3 метою визначення нешкідливості аутовакцини, її антигенної та імуногенної активності, у дослідженнях використовували білих мишей. Для цього сформували чотири групи лабораторних тварин: 1-а група тварин - контрольна у кількості 10 голів, а також три дослідні групи (2, 3, 4) - по 10 голів у кожній групі. 2-й групі тварин вакцинацію проводили аутовакциною із концентрацією інокуляту у 2 млрд. м.к., 3-й - із концентрацією у 4 млрд. м.к., 4-й - у 6 млрд. м.к. Контрольна група тварин залишалась не імунізованою.

Спостереження за тваринами проводили упродовж 21 доби. Під час проведення дослідження на лабораторних тваринах проводили реєстрацію зміни загального стану мишей, наявності реактивних змін у місці введення препарату. 3 метою визначення імуногенності препарату дослідні тварини піддавались дворазовому введенню вакцини у дозі 0,3 мл. Контрольній групі тварин введення препарату не проводилось. Через 14 діб після проведення повторного щеплення тварин заражали польовим штамом *Streptococcus pneumoniae* у дозі 0,5 мл.

Згідно з отриманими результатами, вакцина відповідає вимогам ДСТУ 4483 та ДСТУ 4613. Не було виявлено контамінації препарату бактеріальною, а також грибовою мікрофлорою, зразки дослідного профілактичного засобу пройшли повну інактивацію та виявились нешкідливими для дослідних лабораторних тварин. Під час спостереження за піддослідними тваринами при підшкірному та внутрішньочеревному введенні вакцини не було зареєстровано випадків захворювань тварин, їх загибелі та запальних реакцій у місці введення вакцини. У контрольної групи тварин імунітету до збудника не спостерігалось.

Таблиця 2

Імуногенні властивості вакцини

Групи тварин		Кількість тварин	Концентрація збудника	Заражено голів	% захисту
1(контрольна)		10	-	10	0
Дослідні	2	10	$2 \cdot 10^9$ м.к.	10	90
	3	10	$4 \cdot 10^9$ м.к.	10	100
	4	10	$6 \cdot 10^9$ м.к.	10	100

Згідно з даними таблиці 2 дворазове введення вакцини у білих мишей стимулює забезпечення формування несприйнятливості організму до зараження їх летальними дозами збудника стрептококової інфекції.

Із застосуванням вакцини, виготовленої з місцевого штаму збудника, спостерігається напруження імунітету у тварин до антигенів *Streptococcus pneumoniae*. Захист тварин дослідних груп від експериментального зараження був у межах від 90 до 100 %.

Апробацію виготовленої дослідної серії інактивованої аутовакцини з місцевого штаму збудника *Streptococcus pneumoniae* проводили у приватній агрофірмі "Білий Стік" Сокальського району Львівської області. Для дослідів за принципом аналогів було підібрано 12 телят

двомісячного віку української чорно-рябої породи, з яких було сформовано 3 групи (1 контрольна і 2 дослідні). Тваринам першої дослідної групи вводили інактивовану вакцину проти стрептококових та стафілококових інфекцій виробництва ТОВ "НДП "Ветеринарна медицина" м. Харків. Тваринам другої дослідної групи вводили аутовакцину, виготовлену з місцевого штаму збудника *Streptococcus pneumoniae* із прополісом як ад'ювант. Вакцини вводили внутрішньом'язово двічі з інтервалом у 14 днів у дозі 3 мл при першому та 5 мл при другому введенні.

При введенні інактивованої аутовакцини з місцевого штаму *Streptococcus pneumoniae* телятам другої дослідної групи спостерігається підвищення вмісту лейкоцитів з 7,28 до 14,6 Г/л, лімфоцитів з 45,25 до 51,95 %, Т-лімфоцитів з 46,75 до 59,0 %, Т-хелперів з 22,75 до 33,0 %, ЦІК з 120,00 до 195,0 Ммоль/л. Встановлено підвищення рівня IgG, IgM і IgA після введення досліджуваних вакцин.

Застосування заявленого засобу для профілактики пневмококової інфекції телят сприяє корекції у них показників імунного статусу, що проявляються у збільшенні кількості імунокомпетентних Т- і В-клітин, підвищенні показників неспецифічних тестів захисту, що свідчить про те, що препарат володіє антибактеріальною дією, а також імуномодуючою дією, що дає можливість в подальшому отримати екологічно чисту продукцію.

Отже, створення заявленого засобу профілактики пневмококової інфекції телят забезпечує терапевтичну ефективність до 95-100 % в порівнянні з прототипом при одночасній корекції імунного статусу телят.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб виготовлення вакцини для профілактики пневмококової інфекції телят, що включає отримання антигенів, інактивацію, внесення ад'юванту, який **відрізняється** тим, що штам збудника *Streptococcus pneumoniae* виділяють із рідин та органів хворих або загинув телят із місцевого епізоотичного вогнища, проводять посів на диференційно-діагностичні середовища, ідентифікують та виділяють чисту культуру, використовуючи біопробу, культивують епізоотичний штам у бульйоні Хотінгера з титром 4×10^9 м.к./мл при $t=37^\circ\text{C}$ та рН 7,0-7,8 впродовж 72 годин, інактивують фізичним методом, витримуючи 55-60 хв. на водяній бані при $t=65-70^\circ\text{C}$, додають 4 % спиртоводну емульсію прополісу як ад'ювант, змішуючи компоненти у співвідношенні, %:

Streptococcus pneumoniae 65-75

4 % спиртоводна емульсія прополісу 25-35,

досліджують на предмет відсутності контамінації бактеріальної та грибової мікрофлори згідно з ДСТУ 4483 та мікоплазмами згідно з ДСТУ 4613, визначають на лабораторних тваринах імуногенність, фасують та закупорюють.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ад'ювант виготовляють змішуванням подрібненого прополісу з 70° етиловим спиртом у співвідношенні 1:3, витриманням у закритому посуді 5-7 днів, періодично струшуючи, фільтруванням та розведенням 1:6 у теплій дистильованій воді.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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