

(19) **KG** (11) **438** (13) **C1**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)⁷ **A61K 39/00, 39/10**
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(21) 990054.1

(22) 20.12.1999

(46) 01.03.2001, Бюл. №2

(76) Акылбекова К.Т., Перегудов Т.А., Дадыбаев Ж.М., Ким В.И. (KG)

(56) ОСТ Российской Федерации 08064-19-41-95 "Вакцина против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма №19"

(54) **Вакцина против бруцеллеза животных**

(57) Изобретение относится к ветеринарной медицине для приготовления средств специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота, овец и коз, а также может использоваться при конструировании других иммунологических препаратов против инфекционных болезней сельскохозяйственных и промысловых животных. Предложена вакцина, содержащая 50 об. % штамма *Brucella abortus bovis* № 19 в концентрации 300 млрд. м.кл. в 4 см³ физиологического раствора, а также дополнительно адьювант из смеси 38 об. % минерального масла и 12 об. % безводного ланолина. 2 табл.

Изобретение относится к ветеринарной медицине для приготовления средств специфической профилактики бруцеллеза крупного рогатого скота, овец и коз, а также может использоваться при конструировании других иммунологических препаратов против инфекционных болезней сельскохозяйственных и промысловых животных.

Известна противобруцеллезная вакцина из штамма *Brucella abortus bovis* №19 на 0.85 %-ном растворе NaCl (Справочник "Ветеринарные препараты" / под ред. К.В. Шумилова и др. -М.: "Колос", 1981. - С. 176-194).

Данная противобруцеллезная вакцина применяется в ветеринарной медицине в основном для профилактики бруцеллеза среди крупного и мелкого рогатого скота в дозах соответственно 80 и 40 миллиардов микробных клеток (м.кл.). Существенным недостатком указанного препарата является то, что у животных, привитых этой вакциной, особенно у реиммунизированных, в крови длительное время сохраняются антитела, что препятствует проведению диагностических исследований на бруцеллез и выявлению больных. Оставаясь в стаде, невыявленные больные бруцеллезом животные служат источником заражения здорового скота. Кроме того, она слабо-иммуногенная - до 60-65 %. В связи с указанным, вакцина не вполне удовлетворяет требованиям производства.

Известна вакцина против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма

Brucella abortus bovis №19, изготовленная Всероссийским государственным научно-исследовательским институтом контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. Паспорт штамма от 04.1989, серия №6 (Отраслевой стандарт (ОСТ) Российской Федерации 08064-19-41-95) (прототип).

Недостатком этой вакцины является то, что она имеет большой срок серопозитивности и слабую иммуногенность, а также ее можно использовать не для всех видов домашнего скота. Такое ограничение делает ее непопулярной для практики.

Задачей изобретения является разработка такого препарата, который лишен этих недостатков, то есть является высокоиммуногенным, слабоагглютиногенным или неагглютиногенным, а также универсальным для всех видов домашнего скота.

Разработана вакцина против бруцеллеза животных на основе штамма *Brucella abortus bovis* №19, дополнительно содержащая в своем составе адъювант из минерального масла и безводного ланолина при соотношении компонентов в объемных процентах:

минеральное масло	38.0
безводный ланолин	12.0
штамм <i>Brucella abortus bovis</i> №19 в концентрации	300 млрд. м. кл. в 4 см ³
физиологический раствор	50.0.

Приготовление указанной вакцины состоит из двух частей.

Первая часть: Для приготовления 1 л адъюванта необходимо взять 160 г ланолина безводного и 840 см³ минерального масла.

Ланолин в необходимом количестве растапливают в котле с рубашкой, затем с помощью вакуума передают в эмульгатор, куда добавляют минеральное масло в расчетном количестве. Смесь перемешивают и стерилизуют при температуре $125 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

При изготовлении небольших объемов масло-ланолиновую смесь разливают по баллонам и стерилизуют при температуре $115 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 40 мин.

Адъювант исследуют на стерильность путем посева в 2 пробирки с каждой средой: мясопептонным агаром (МПА), мясопептонным бульоном (МПБ), мясопептонным печеночным бульоном под вазелиновым маслом и средой Сабуро. Посевы выдерживают при температуре 37°C в течение 10 сут (среда Сабуро - при температуре $22-24^\circ\text{C}$). Роста микроорганизмов на всех средах не должно быть.

Для приготовления адъюванта используют эмульгатор или коллоидные мельницы. Эмульгатор стерилизуют вместе с масло-ланолиновой смесью при температуре $125 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Съёмные части коллоидных мельниц стерилизуют в автоклаве при температуре $125 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30-40 мин.

Ланолин - жиропот овечьей шерсти. Это мазеобразная масса, состоящая из жирных кислот, холестерина и эфиров изохолестерина с церотиновой и пальметиновой кислотами. Обладает хорошими эмульгирующими свойствами и благодаря этому широко используется при изготовлении масляных адъювантов (Болотников И.Н. Словарь иммунологических терминов. - М., 1991. - С. 73).

Ланолин очень стоек и может долго храниться (годами) без изменения.

Мази, изготовленные на ланолине, легко втираются и долго держатся на поверхности кожи (Мозгов И.Е. Фармакология. - М., 1969. - С. 170);

Вторая часть: получение бактериальной массы *Brucella abortus bovis* №19 в концентрации 300 млрд. м.кл. в 1 мл физиологического раствора.

Бактериальную массу получают по методике "Отраслевого стандарта Российской Федерации. Вакцина против бруцеллеза сельскохозяйственных животных из штамма 19". Технические условия - 08064-19-41-95 от 1995 г., ОКП 93 8411.

Изготовленную бактериальную массу выдерживают в холодильнике при

температуре +6°C не менее 10 дней. Одновременно проверяют на стерильность путем пересевов в 2 пробирки с мясопептонным бульоном (МПБ), мясопептонным агаром (МПА), мясопептонным печеночным бульоном (МППБ) под вазелиновым маслом, средой Сабуро и 2 флакона с МПБ. Через 5 суток делают пересевы из флаконов с МПБ на МПБ, МПА на МППА под вазелиновым маслом. Роста культур на всех средах не должно быть.

Приготовление вакцины

1. способ. Равные объемы бактериальной массы с концентрацией 300 млрд. м.кл. в 1 см³ и маслोलанолиновой смеси при постоянной работе мешалок эмульгатора по закрытой системе под давлением 0.5 атм подают через тройник на 2-3 последовательно соединенные коллоидные мельницы с зазором ножей 0.2-0.0, при этом на коллоидные мельницы первой должна поступать маслोलанолиновая смесь, но не баксуспензия бруцелл.

2. способ. Бактериальную суспензию с концентрацией 300 млрд. м.кл. в 1 см³ перекачивают в эмульгатор, чтобы соотношение маслोलанолиновой смеси и бактериальной суспензии было 50:50. После перекачки бактериальной суспензии включают эмульгатор на 20-30 мин и следят, чтобы температура эмульсии была не выше 30°C. В рубашку эмульгатора подают холодную воду. Смесь бактериальной суспензии и маслोलанолиновой с эмульгатором по закрытой системе собирают в стерильный реактор-сборник для расфасовки.

Для проверки стерильности эмульсионной вакцины делают высевы на МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом, среду Сабуро (по две пробирки каждой среды). Посевы выдерживают в термостате, при температуре 37°C 5 суток. Роста культуры на всех средах не должно быть.

Вакцину хранят в реакторе-сборнике при температуре 6-8°C, с периодическим перемешиванием (один раз в 24 ч в течение 5-10 мин).

Перед расфасовкой вакцину подогревают до температуры 15-20°C и при соблюдении асептических условий разливают в стерильные флаконы емкостью 100 мл. Во время розлива вакцину постоянно перемешивают. Флаконы после наполнения вакциной сразу же закупоривают стерильными резиновыми пробками, обкатывают алюминиевыми колпачками, обеспечивающими герметичность, этикетируют и хранят при температуре 2-8°C.

На этикетках флаконов указывают полное наименование препарата, товарный знак предприятия-изготовителя, номер серии, количество вакцины во флаконе, номер государственного контроля, дату изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения.

Для проверки стерильности вакцины в начале, середине и конце расфасовки каждой серии делают высевы на МП Б, МП А, МППБ под вазелиновым маслом, среду Сабуро (по 2 пробирки каждой среды).

При условии стерильности всех высевов в течение 5 дней расфасованную и этикетированную серию вакцины передают на контроль.

Флаконы с вакциной обертывают бумагой и укладывают в картонные коробки.

Внутри каждой коробки вкладывают наставление по применению вакцины в 3-х экземплярах и контрольный лист с указанием наименования биопрепарата, его количества в коробке, номера серии, даты упаковки, фамилии или номера упаковщика.

Каждую серию приготовленной вакцины против бруцеллеза сельскохозяйственных животных проверяют на внешний вид, наличие механических примесей, плесени, стерильность, стабильность эмульсии, безвредность.

Для проверки качества вакцины от каждой серии из разных мест делают выборку в количестве 10 флаконов, из которых 5 используют для проведения испытания, а 5 флаконов хранят в архиве государственного контролера в течение 24 мес. при температуре 2-10°C.

Для определения внешнего вида, цвета, наличия посторонних примесей, неразбивающихся конгломератов, отслоившейся водной фазы флаконы с вакциной просматривают визуально. Одновременно проверяют плотность укупорки и правильность этикетировки.

Вакцина - жидкость белого цвета, слегка вязкой сливкообразной консистенции. При хранении вакцины допускается незначительное отслоение адьюванта (не более 1 см) в верхнем слое. При встряхивании вакцина приобретает однородную, гомогенную структуру.

Наличие в вакцине посторонних примесей и плесени не допускается. В случае наличия других дефектов в отдельных флаконах их также выбраковывают.

Для проверки стерильности берут 5 флаконов с вакциной и делают высевы по 0.3-0.5 мл в пробирки с МП Б, МПА, МППБ под вазелиновым маслом, агар Сабуро. Посевы проводят в 2 пробирки с каждой средой. Посевы выдерживают при температуре 37-38°C, на агаре Сабуро - при температуре 22-24°C. Посевы должны оставаться стерильными в течение 10 дней.

Для установления стабильности вакцины флаконы, из которых производили высевы на стерильность, выдерживают в термостате при температуре 37°C в течение 14 дней. По истечении указанного срока расслоения вакцины на эмульсию и водную фазу не должно быть. Допускается отслоение масла на поверхности вакцины (не более 1 см).

Для проверки безвредности используют смесь вакцины из 3-х флаконов, из которых после встряхивания отбирают по 10-15 мл препарата в стерильный флакон и общую пробу разводят 1:5 стерильным физиологическим раствором.

Безвредность каждой серии вакцины проверяют на 5 белых мышах массой 15-18 г, а смесь 3-8 серий вакцины на 5 морских свинках массой 350-500 г. Предварительно разведенную вакцину вводят белым мышам в дозе 0.2 см³ подкожно в области спины и морским свинкам в дозе 1 см³ подкожно в область паха. Вакцина не должна вызывать гибель белых мышей в течение 10 дней, морских свинок - 20-25 суток. При убое морских свинок через 20-25 дней во внутренних органах не должно быть видимых патологоанатомических изменений, характерных для бруцеллезной инфекции. На месте введения вакцины допускается образование асептических уплотнений.

При наличии изменений во внутренних органах, лимфатических узлах, гибели мышей или морских свинок, исследование каждой серии препарата на безвредность проводят повторно на 5 белых мышах и 5 морских свинках. Если при повторной проверке через 20-25 суток после введения вакцины при макроскопическом осмотре у убитых морских свинок будут обнаружены специфические изменения, характерные для бруцеллеза, в лимфатических узлах, селезенке или печени (некроз, серовато-матовые точечные узелки, мелкие гнойники и абсцессы) или некроз мышц хотя бы у одной свинки, то серию вакцины бракуют.

Вакцину хранят на предприятии-изготовителе и у потребителя в сухом темном месте при температуре 2-10°C в пределах годности. Срок годности вакцины 24 мес. со дня ее изготовления.

Определение иммуногенности вакцины проводили на телках. В опыт брали 30 клинически здоровых телок 8-10-месячного возраста, не подвергавшихся вакцинации против бруцеллеза и полученных из хозяйств, благополучных по бруцеллезу.

Вакцину вводили 10 животным под кожу в область верхней трети шеи в объеме 1 мл 10 гол. ввели вакцину (прототип) в стандартной дозе (80 млрд. м.кл.) и 10 телок оставили без вакцинации.

Через 10 мес. вакцинированных и 10 контрольных телок-аналогов (неиммунизированных) заразили стандартной культурой контрольного вирулентного штамма *Brucella abortus bovis* 54 М (ВГНКИ).

Иммунизированных и контрольных телок заразили в дозе 15-20 ИД₅₀ в объеме 0.2 см³. Взвесь бруцелл наносили на конъюнктиву глаз по 0.1 см³. Через 40 дней после

заражения животных убивали и проводили бактериологическое исследование лимфатических узлов: заглоточных, подчелюстных, околоушных, предлопаточных, надвыменных, паховых, парааортальных, гипогастральных, средостенных, брыжеечных и органов - селезенки (из двух мест), печени на средах, используемых для выращивания бруцелл - на одну пробирку бульона и две пробирки агара из каждого объекта.

Посевы инкубировали в термостате при температуре 37-38°C в течение двух недель с периодическим учетом роста культуры бруцелл. От всех невакцинированных животных была выделена культура контрольного штамма *Brucella abortus bovis* 54 М (ВГНКИ). Культура бруцелл также была выделена от 4-х телок, привитых вакциной по прототипу. От вакцинированных телок культура вирулентного штамма не выделена (табл. 1).

Таблица 1

**Результаты бактериологического исследования органов телок,
иммунизированных вакциной по прототипу и контрольной группы**

Наименование группы животных	Количество голов	День забоя животных	Выделена культура бруцелл у животных (голов)
Иммунизированные вакциной	10	40	-
Вакцинированные вакциной по прототипу	10	40	4
Контрольная группа	10	40	10

Таким образом, результаты, полученные при бактериологическом исследовании, показали, что у привитых вакциной телок иммунитет составил 100 %, тогда как у животных, иммунизированных вакциной по прототипу, не превышал 60 %, а у контрольных телок было заражение у всех 100 %.

Изучалась способность вакцины стимулировать у животных синтез антител. Опыты проводили на телках 10-12-месячного возраста из благополучного по бруцеллезу хозяйства.

Всего в опыт было взято 60 голов. Из них 20 - были привиты вакциной, 20 - вакциной по прототипу и 20 телок были контрольными.

Посредством серологических реакций - роз бенгал пробы (РПБ), реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК) - исследовали сыворотки крови опытных животных через 15, 30 дней и далее ежемесячно в течение года.

РА ставили в разведениях сыворотки от 1:50 до 1:1600; РСК - от 1:5 до 1:320. Результаты серологических исследований сывороток крови подопытных животных приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты исследования

Срок исследования	Исследование голов (опытных и контрольных)	Реагировало					
		РПБ		РА		РСК	
		положительных	%	положительных	%	положительных	%
15	вакцина	20	100	20	100	20	100
	прототип	20	100	20	100	20	100
	контроль	-	-	-	-	-	-

30	вакцина прототип контроль	20 20 -	100 100 -	20 20 -	100 100 -	20 20 -	100 100 -
60	вакцина прототип контроль	10 20 -	50 100 -	10 20 -	50 100 -	10 20 -	50 100 -
90	вакцина прототип контроль	5 20 -	25 100 -	5 20 -	25 100 -	5 20 -	25 100 -
120	вакцина прототип контроль	- 20 -	- 100 -	- 20 -	- 100 -	- 20 -	- 100 -
150	вакцина прототип контроль	- 17 -	- - -	- 16 -	- - -	- 15 -	- - -
180	вакцина прототип контроль	- 15 -	- - -	- 15 -	- - -	- 14 -	- - -
360	вакцина прототип	- 2	- 10	- 2	- 10	- 1	- 5

Из приведенных данных (табл. 2) видно, что на 15-й день в опытной группе животных, иммунизированных вакциной 100 % телок реагировали положительно в РБП, РА и РСК. Через 60 дней после применения вакцины серопозитивные реакции сохранились у 50 % животных, т.е. у 10 голов.

К 120-му дню животных, реагирующих по указанным тестам, не было и в последующие дни исследования они также не выявлялись. Тогда как на протяжении всего опыта в группе иммунизированных вакциной по прототипу большинство животных реагировало положительно вплоть до 360-го дня (10 %).

Таким образом, у животных, иммунизированных вакциной к 120-му дню иммунологические реакции угасали полностью, что дает возможность исследовать на бруцеллез привитых животных уже к этому сроку, т.е. контролировать эпизоотическое состояние по данной инфекции уже через 4 мес. после вакцинации, что ускоряет срок оздоровления неблагополучных гуртов по бруцеллезу в 4-5 раз в сравнении с применением вакцины.

Оригинальность этого изобретения заключается в том, что без больших финансовых затрат и за короткое время (2-3 года) на базе уже имеющегося препарата создана новая, высокоэффективная противобруцеллезная вакцина с иммуногенностью до 100 % и серопозитивностью в 3-4 раза ниже, чем у известных такого рода препаратов.

Такой эффект от применения вакцины достигается за счет появления биологических реакций у привитых животных: реакция макрофагов, которая повышает гуморальный и клеточный иммунный ответ, стимулируя естественную резистентность к микробным инфекциям.

В настоящее время технические условия указанной вакцины позволяют изготавливать препарат не только на биофабриках, биокOMBинатах, но и в микробиологических лабораториях.

Формула изобретения

Вакцина против бруцеллеза животных, содержащая культуру штамма *Brucella abortus bovis* №19, отличающаяся тем, что содержит дополнительно в своем составе адьювант, состоящий из минерального масла и безводного ланолина в следующих соотношениях (об. %):

минеральное масло	38.0
безводный ланолин	12.0
штамм <i>Brucella abortus bovis</i> №19 в	300 млрд. м.
концентрации	кл. в 4 см ³
физиологический раствор	50.0.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Никифорова М.Д.
Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03