



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005111209/13, 18.04.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.04.2005

(45) Опубликовано: 10.10.2006 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 5284653 A, 08.02.1994. US 4223014
A, 16.09.1980. EP 1001016, 17.05.2000. WO
9955835 A, 17.05.2000.

Адрес для переписки:

107140, Москва, ул. В. Красносельская, 17,
ВНИРО, патентный отдел, Т.В. Шульгиной

(72) Автор(ы):

Бондаренко Виктор Зиновьевич (RU),
Мельник Николай Васильевич (RU),
Шумилов Константин Васильевич (RU),
Скляр Огег Дмитриевич (RU),
Безгачина Татьяна Владимировна (RU),
Апалькин Виктор Александрович (RU),
Литвинов Олег Борисович (RU),
Елесеев Анатолий Константинович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие Всероссийский научно-
исследовательский институт рыбного хозяйства
и океанографии (ФГУП ВНИРО) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИБРИОЗА РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Способ включает получение матровых расплодов
штаммов *Vibrio anguillarum* на питательной среде,
смешивание их и культивирование в ферментере,
инактивацию выращенной культуры формалином и
расфасовку. В качестве штаммов *Vibrio anguillarum*
используют штамм *Vibrio anguillarum* №2 и штамм

Vibrio anguillarum VUR-19, матровые расплодки
которых смешивают в равном соотношении.
Расфасовку вакцины осуществляют с
концентрацией микробных клеток 80-100 млрд/мл
питательной среды. Способ позволяет получить
вакцину, обладающую высокой профилактической
и лечебной активностью. 4 з.п. ф-лы, 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/02 (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005111209/13, 18.04.2005**(24) Effective date for property rights: **18.04.2005**(45) Date of publication: **10.10.2006 Bull. 28**

Mail address:

**107140, Moskva, ul. V. Krasnosel'skaja, 17,
VNIRO, patentnyj otdel, T.V. Shul'ginov**

(72) Inventor(s):

**Bondarenko Viktor Zinov'evich (RU),
Mel'nik Nikolaj Vasil'evich (RU),
Shumilov Konstantin Vasil'evich (RU),
Skjarov Oleg Dmitrievich (RU),
Bezgachina Tat'jana Vladimirovna (RU),
Apal'kin Viktor Aleksandrovich (RU),
Litvinov Oleg Borisovich (RU),
Eleseev Anatolij Konstantinovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriatie Vserossijskij nauchno-
issledovatel'skij institut rybnogo
khozjajstva i okeanografii (FGUP VNIRO) (RU)**

(54) **METHOD FOR OBTAINING INACTIVATED VACCINE AGAINST VIBRIOSIS IN FISH**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: the present innovation deals with obtaining certain broods of *Vibrio anguillarum* strains upon nutritive medium followed by their mixing, cultivating in fermenter, inactivation of grown culture with formalin and packaging. As strains of *Vibrio anguillarum* it is necessary to apply the strain of *Vibrio anguillarum* N2 and

that of *Vibrio anguillarum* VUR-19 the broods of which should be mixed at equal ratio. Packaging of vaccine should be fulfilled at concentration of microbial cells being 80-100 bln/ml nutritive medium. The innovation enables to obtain vaccine of high prophylactic and curative activity.

EFFECT: higher efficiency.

4 cl, 1 dwg, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к рыбоводству, к способам получения лечебно-профилактических препаратов для лечения вибриоза рыб.

Вибриоз рыб - это опасное бактериальное заболевание. Встречается у 42 видов рыб и гидробионтов в 16 странах мира в солоноватой, морской и пресной воде. Клиническими признаками заболевания являются покраснение кожных покровов, ерошение чешуи, язвы на поверхности тела рыбы, воспаление анального отверстия. При патологоанатомическом вскрытии наблюдаются наличие гнойного экссудата в полости тела рыбы, увеличение и потемнение почек, точечные кровоизлияния в печени. Это заболевание имеет несколько форм течения, от хронического - с покраснением участков наружных покровов и образованием язв на поверхности тела, до острого септического, характеризующегося внезапной гибелью рыб без внешних признаков поражения. В настоящее время отсутствует специфическая профилактика заболевания, а борьба сводится к организационно-хозяйственным и ветеринарно-санитарным мероприятиям.

Технической задачей заявленного изобретения является получение бивалентной вакцины, обладающей стабильной антигенной и иммуногенной активностью.

Поставленная задача достигается тем, что способ получения бивалентной вакцины против вибриоза рыб (см. чертеж) включает подготовку питательной среды для матровых расплодов штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 и культивирование в ферментере, при этом в качестве питательной среды берут смесь, содержащую перевар Хоттингера, пептон, натрий фосфорно-кислый двузамещенный, натрий хлористый и воду, матровые расплодки ведут 3-мя пассажами, а культивирование - в течение 36-48 ч при температуре 18-25°C и постоянном перемешивании, по окончании массу инактивируют 0,5% формалином и гомогенизируют в течение 5-6 мин при скорости перемешивания 3-8 тыс. об/мин, затем расфасовывают в емкости по 200 - 500 мл с концентрацией бактериальных клеток 80-100 млрд/мл.

Для изготовления вакцины используют два штамма возбудителя вибриоза рыб *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19, которые хранятся и поддерживаются в ВГНКИ ветпрепаратов и имеют регистрационные номера 78 и 7-25/1 и выделены в Балтийском и Черноморском регионах России соответственно.

Штамм *Vibrio anguillarum* №2 обладает генетически закрепленными культуральными морфологическими и биохимическими свойствами, характеризующимися следующими признаками. Величина клеток односуточной агаровой культуры (1,6-2,5)×(0,4-1,0) мкм. Слабоизогнутые палочки, подвижные, с одним полярно расположенным жгутиком. Спор и капсул не образует. По Граму не окрашивается. На мясо-пептонном агаре с 1,5% NaCl (pH 7,2-7,4) через 24 ч при 20°C образуются гладкие колонии, блестящие с ровными краями. Щелочной мясо-пептонный агар (pH 8,0-8,2): через 24 ч мелкие, крупные, S-блестящие колонии. На дифференциально-диагностическом агаре с пенициллином (pH 8,0-8,2) через 24-48 ч на сине-зеленом фоне образуются выпуклые, гладкие S-колонии желтого цвета. Физико-биохимические признаки. Размножаются при температуре 5-35°C pH 7,2-8,2.

Оптимальная концентрация NaCl в питательной среде 1,5%. Разжижает желатину, гидролизует крахмал, дает альфа-гемолиз на кровяном агаре. Реакция на оксидазу, каталазу, тест окисления - ферментации по Хью-Лейфсону, на ацетилметилкарбинол - положительная. Восстанавливает нитраты до нитритов, сероводорода не образует, мочевины не расщепляет. Обладает специфическим антигеном. Агглютинируется диагностической сывороткой *Vibrio anguillarum*.

Штамм *Vibrio anguillarum* VUR-19 обладает стабильными, генетическими закрепленными культурально-морфологическими и физико-биохимическими свойствами, хорошей иммуногенностью со способностью вызывать образование антител, а также выраженной способностью к размножению и продукции бактериальной массы. Величина клеток односуточной агаровой культуры (1,6-2,5)×(0,4-1,0) мкм. Это слабоизогнутые, подвижные палочки, с одним полярно расположенным жгутиком. Спор и капсул не образует. По Граму не окрашивается. На мясо-пептонном агаре с добавлением 1,5% NaCl (pH 7,2-7,4) наблюдается хороший рост штамма через 24 ч при 20°C, колонии гладкие, блестящие с

ровными краями размером 2 мм. На щелочном, мясо-пептонном агаре (рН 8,0-8,2) через 24 ч появляются мелкие, блестящие колонии размером 4 мм. На дифференциально-диагностическом агаре с пенициллином (рН 8,0-8,2): через 24-48 ч на сине-зеленом фоне образуются выпуклые гладкие колонии желтого цвета размером 2-3 мм. Физико-биохимические признаки. Штамм галофильный, размножается при 5-35°C, оптимум роста при 18-25°C. Оптимальная концентрация NaCl в питательных средах 1,5%, рН 7,2-8,2.

Разжижает желатину, гидролизует крахмал, дает L-гемолиз на кровяном агаре.

Восстанавливает нитраты до нитритов, сероводорода не образует, мочевины не расщепляет. Обладает специфическим антигеном и отличается от известных штаммов рода *Vibrio* по своим антигенным свойствам. В перекрестных реакциях агглютинируется гомологичной диагностической сывороткой в реакции агглютинации (РА) в титре антител 1:3200. Штамм стабилен. Адаптирован на питательных средах.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом.

Для приготовления 100 л питательной среды берут 25 л перевара Хоттингера, заливают в пищеварочный котел, добавляют воду до содержания аминного азота не менее 160-180 мг %. Затем добавляют 500 мл пептона, 200 мл натрия фосфорнокислого двузамещенного, 1500 мл натрия хлористого и 15 л воды на выкипание. Доводят смесь до кипения.

Устанавливают рН 7,8-8,0 и кипятят 40 мин, отстаивают 60 мин, затем фильтруют и перекачивают в реактор, где далее будет проходить культивирование. Стерилизацию питательной среды в реакторе проводят при 120°C в течение 40 мин. Готовая питательная среда должна быть стерильной, прозрачной, рН 7,4-7,8, и содержать аминного азота 160-180 мг %.

Получение матровой расплодки 1-го пассажа. Сухие штаммы, полученные из ВГНКИ, ресуспендируют путем внесения в ампулы по 1,0-1,5 см³, стерильного МПА и высевают в объеме 0,3-0,5 см³ на пробирки с МПА, предварительно приготовленные. Пробирки с высевом оставляют на 2-е суток в темном месте при температуре 18-25°C. Одновременно делают контрольные высевы.

Получение матровой расплодки 2-го пассажа. После проверки выросших культур на чистоту и типичность роста ее пересевают бактериологической петлей на скошенный МПА, содержащий 1,5% NaCl. Через 2-е суток выросшую культуру смывают физраствором и высевают во флаконы емкостью 500 см³ с питательной средой из расчета 1-2 пробирки на 1 флакон.

Получение матровой расплодки 3-го пассажа. Через 2 суток при отсутствии роста посторонней микрофлоры производственные расплодки штаммов из флаконов пересевают в бутыли емкостью 10 л с питательной средой.

Культивирование. Матровые расплодки засевают в реактор каждого штамма из расчета 5% каждого к объему питательной среды. Выращивание ведут в течение 36-48 ч при температуре 18-25°C и постоянном перемешивании. Выращенную культуру штаммов инактивируют добавлением в реактор формалина до его конечной концентрации 0,5%. Инактивацию ведут в течение 24 ч при температуре 37°C и перемешивании через каждые 2 ч. По окончании бакмассу гомогенизируют в течение 5-6 мин при скорости перемешивания 3-8 тыс. об/мин. Затем расфасовывают в емкости по 200 - 500 мл с концентрацией бактериальных клеток 80-100 млрд/мл.

Использование в вакцине только одного штамма не создает напряженного иммунитета против других серогрупп возбудителя. Штаммы *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 отличаются друг от друга своей серологической активностью и набором поверхностно-оболочечных антигенов, что позволяет создать у рыб иммунитет против более широкого спектра циркулирующих в природе эпизоотических штаммов *Vibrio anguillarum*.

Для сравнения антигенной активности и специфичности штаммов, используемых в вакцине, проводят перекрестные серологические реакции с гомологичными и гетерологичными сыворотками, полученными на кроликах. При постановке реакции агглютинации /РА/ на кроликах кроличьи сыворотки с предельным титром /1:3200/

разводят формализированным раствором от 1:25 до 1:3200. Результаты испытания антигенов в РА были следующие: антиген из штамма *Vibrio anguillarum* №2 агглютинировался гомологичной сывороткой в титре 1:1600, а с гетерологичной, т.е. полученной на штамм VUR-19, в титре 1:200. Антиген из штамма VUR-19 агглютинировался

5 гомологичной сывороткой в титре 1:800, а гетерологичной, т.е. полученной на штамм *Vibrio anguillarum* №2, агглютинировался в титре 1:100, что указывает на их определенную активность и специфичность по отношению друг к другу. Концентрацию антигена в РА использовали 1 млрд микробных клеток в 1 мл.

Пример 1. Для приготовления 100 л питательной среды берут 20 л перевара Хоттингера,

10 заливают в пищеварочный котел, добавляют воду до содержания аминного азота не менее 160 мг %. Затем добавляют 100 мл пептона, 200 мл натрия фосфорнокислого двузамещенного, 1000 мл натрия хлористого и 20 л воды на выкипание. Доводят смесь до кипения. Устанавливают pH 7,8 и кипятят 40 мин, отстаивают 60 мин, затем фильтруют и перекачивают в реактор, где далее будет проходить культивирование. Стерилизацию

15 питательной среды в реакторе проводят при 120°C в течение 40 мин. Готовая питательная среда должна быть стерильной, прозрачной, pH 7,4, и содержать аминного азота 160 мг %.

Получение матровой расплодки 1-го пассажа. Сухие штаммы, полученные из ВГНКИ, ресуспендируют путем внесения в ампулы по 1,0 см³ стерильного МПБ и высевают в

20 объеме 0,3 см³ на пробирки с МПА, предварительно приготовленные. Пробирки с высевом оставляют на 2-е суток в темном месте при температуре 18°C. Одновременно делают контрольные высевы.

Получение матровой расплодки 2-го пассажа. После проверки выросших культур на чистоту и типичность роста ее пересевают бактериологической петлей на скошенный МПА,

25 содержащий 1,5% NaCl. Через 2-е суток выросшую культуру смывают физраствором и высевают во флаконы емкостью 500 см³ с питательной средой из расчета 1 пробирка на 1 флакон.

Получение матровой расплодки 3-го пассажа. Через 2 суток при отсутствии роста посторонней микрофлоры производственные расплодки штаммов из флаконов пересевают

30 в бутыли емкостью 10 л с питательной средой.

Культивирование. Матровые расплодки засевают в реактор каждого штамма из расчета 5% каждого к объему питательной среды. Выращивание ведут в течение 36 ч при

35 температуре 18°C и постоянном перемешивании. Выращенную культуру штаммов инактивируют добавлением в реактор формалина до его конечной концентрации 0,5%. Инактивацию ведут в течение 24 ч при температуре 37°C и перемешивании через каждые 2 ч. По окончании бакмассу гомогенизируют в течение 5 мин при скорости перемешивания 8 тыс. об/мин. Затем расфасовывают в емкости по 500 мл с концентрацией бактериальных клеток 80 млрд/мл.

Бивалентная инактивированная вакцина характеризуется стерильностью,

40 стабильностью, безвредностью и иммуногенностью.

Пример 2. Для приготовления 100 л питательной среды берут 25 л перевара Хоттингера,

45 заливают в пищеварочный котел, добавляют воду до содержания аминного азота не менее 180 мг %. Затем добавляют 500 мл пептона, 200 мл натрия фосфорнокислого двузамещенного, 1500 мл натрия хлористого и 15 л воды на выкипание. Доводят смесь до кипения. Устанавливают pH 8,0 и кипятят 40 мин, отстаивают 60 мин, затем фильтруют и перекачивают в реактор, где далее будет проходить культивирование. Стерилизацию

50 питательной среды в реакторе проводят при 120°C в течение 40 мин. Готовая питательная среда должна быть стерильной, прозрачной, pH 7,8, и содержать аминного азота 180 мг %.

Получение матровой расплодки 1-го пассажа. Сухие штаммы, полученные из ВГНКИ ресуспендируют путем внесения в ампулы по 1,5 см³ стерильного МПБ и высевают в

50 объеме 0,5 см³ на пробирки с МПА, предварительно приготовленные. Пробирки с высевом оставляют на 2-е суток в темном месте при температуре 25°C. Одновременно делают контрольные высевы.

Получение матровой расплодки 2-го пассажа. После проверки выросших культур на чистоту и типичность роста ее пересевают бактериологической петлей на скошенный МПА, содержащий 1,5% NaCl. Через 2-е суток выросшую культуру смывают физраствором и высеваяют во флаконы емкостью 500 см³ с питательной средой из расчета 2 пробирки на 1 флакон.

Получение матровой расплодки 3-го пассажа. Через 2 суток при отсутствии роста посторонней микрофлоры производственные расплодки штаммов из флаконов пересевают в бутыли емкостью 10 л с питательной средой.

Культивирование. Матровые расплодки засевают в реактор каждого штамма из расчета 5% каждого к объему питательной среды. Выращивание ведут в течение 48 ч при температуре 25°C и постоянном перемешивании. Выращенную культуру штаммов инактивируют добавлением в реактор формалина до его конечной концентрации 0,5%. Инактивацию ведут в течение 24 ч при температуре 37°C и перемешивании через каждые 2 ч. По окончании бакмассу гомогенизируют в течение 6 мин при скорости перемешивания 3-8 тыс. об/мин. Затем расфасовывают в емкости по 200 мл с концентрацией бактериальных клеток 80-100 млрд/мл.

Бивалентная инактивированная вакцина характеризуется стерильностью, стабильностью, безвредностью и иммуногенностью.

Формула изобретения

1. Способ получения инактивированной вакцины против вибриоза рыб, включающий получение матровых расплодок штаммов *Vibrio anguillarum* на питательной среде, смешивание их и культивирование в ферментере, инактивацию выращенной культуры формалином и расфасовку, отличающийся тем, что в качестве штаммов *Vibrio anguillarum* используют штамм *Vibrio anguillarum* №2 и штамм *Vibrio anguillarum* VUR-19, матровые расплодки которых смешивают в равном соотношении, а расфасовку вакцины осуществляют с концентрацией микробных клеток 80-100 млрд/мл питательной среды.

2. Способ получения инактивированной вакцины по п.1, отличающийся тем, что в качестве питательной среды используют питательную среду, содержащую перевар Хоттингера, пептон, натрий фосфорно-кислый замещенный, натрий хлористый и воду.

3. Способ получения инактивированной вакцины по п.1, отличающийся тем, что матровые расплодки получают путем проведения трех пассажей штаммов *Vibrio anguillarum* №2 и *Vibrio anguillarum* VUR-19 на питательной среде.

4. Способ получения инактивированной вакцины по п.1, отличающийся тем, что культивирование матровых расплодок в ферментере осуществляют в течение 36-48 ч при температуре 18-25°C и постоянном перемешивании.

5. Способ получения инактивированной вакцины по п.1, отличающийся тем, что инактивацию выращенной культуры осуществляют 0,5%-ным формалином.

Технологическая схема производства бивалентной вакцины.

подготовка основного сырья

приготовление:
перевара Хоттингера мясной воды
МПА производственной среды

подготовка посевного материала

получение расплодок
1 пассажа 2 пассажа 3 пассажа

производственное культивирование в ферментере

обработка бакмассы
инактивация концентрирование диспергирование

получение вакцины
составление серии фасовка укупорка этикеровка
контроль вакцины