



(51) МПК

*A61K 39/02* (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005111211/13, 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 A, 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 Оleg 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) ИНАКТИВИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ВИБРИОЗА РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
микробиологии. Вакцина содержит смесь суспензий  
микробных клеток штамма *Vibrio anguillarum* №2 и  
штамма *Vibrio anguillarum* VUR-19, взятых в равном

соотношении с концентрацией 80-100 млрд  
микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды.  
Вакцина обладает высокой профилактической и  
лечебной активностью. 1 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*A61K 39/02* (2006.01)

*C12N 1/20* (2006.01)

*A61P 31/04* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005111211/13, 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) **INACTIVATED VACCINE AGAINST VIBRIOSIS IN FISH**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology.

SUBSTANCE: the suggested vaccine contains the mixture of suspensions of microbial cells of *Vibrio anguillarum* N2 strain and *Vibrio anguillarum* VUR-19 strain taken at equal ratio at

concentration being about 80-100 bln microbial cells/cu. cm nutritive medium. The present vaccine is of high prophylactic and curative activity.

EFFECT: higher efficiency.

2 ex

RU 2 2 8 4 8 3 1 C 1

RU 2 2 8 4 8 3 1 C 1

Изобретение относится к микробиологии, в частности к ихтиопатологии, а именно к средствам профилактики вибриоза рыб, вызываемой бактерией *Vibrio anguillarum*.

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 высокоэффективного профилактического средства против вибриоза рыб.

Поставленная задача достигается тем, что бивалентная инактивированная вакцина против вибриоза рыб, содержит смесь суспензий микробных клеток культур штамма *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19, взятых в равном соотношении с концентрацией 80-100 млрд микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды, инактивированных 0,5% раствором формалина.

Вакцина представляет собой гомогенную суспензию серовато-желтого цвета с рыхлым осадком, легко разбивающимся в гомогенную взвесь.

Производственные штаммы *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 хранятся и поддерживаются в ВГНКИ ветпрепаратов и имеют регистрационные номера 78 и 7-25/1 и выделены в Балтийском и Черноморском регионах России соответственно.

Антигенная активность. Однократное подкожное введение вакцины 4 кроликам массой 2,5-3 кг в объеме 1 см<sup>3</sup> должно вызывать образование у всех привитых животных агглютининов против *Vibrio anguillarum* №2 и VUR-19 в титре не ниже 1:100 с оценкой реакции 3-4 креста.

Срок годности вакцины 2 года при условии хранения в темном сухом помещении при температуре от 2 до 10°C.

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 подвижны 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. На щелочном мясо-пептонном агаре (pH 8,0-8,2) через 24 ч мелкие, крупные, блестящие S колонии. Дифференциально-диагностический агар с пенициллином (pH 8,0-8,2) через 24-48 ч на сине-зеленом фоне выпуклые, гладкие S колонии желтого цвета. Физико-биохимические признаки. Размножаются при 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 мясопептонном 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 ровным краем, размером 2мм. На щелочном, мясопептонном агаре (pH 8,0-8,2) через 24 ч появляются мелкие, блестящие S колонии размером 4мм. На дифференциально-диагностический агар с пенициллином (pH 8,0-8,2) через 24-48 ч на сине-зеленом фоне образуются выпуклые гладкие S 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%, pH 7,2-8,2. Разжижает желатину, гидролизует крахмал, дает L-гемолиз на кровяном агаре.

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

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*.

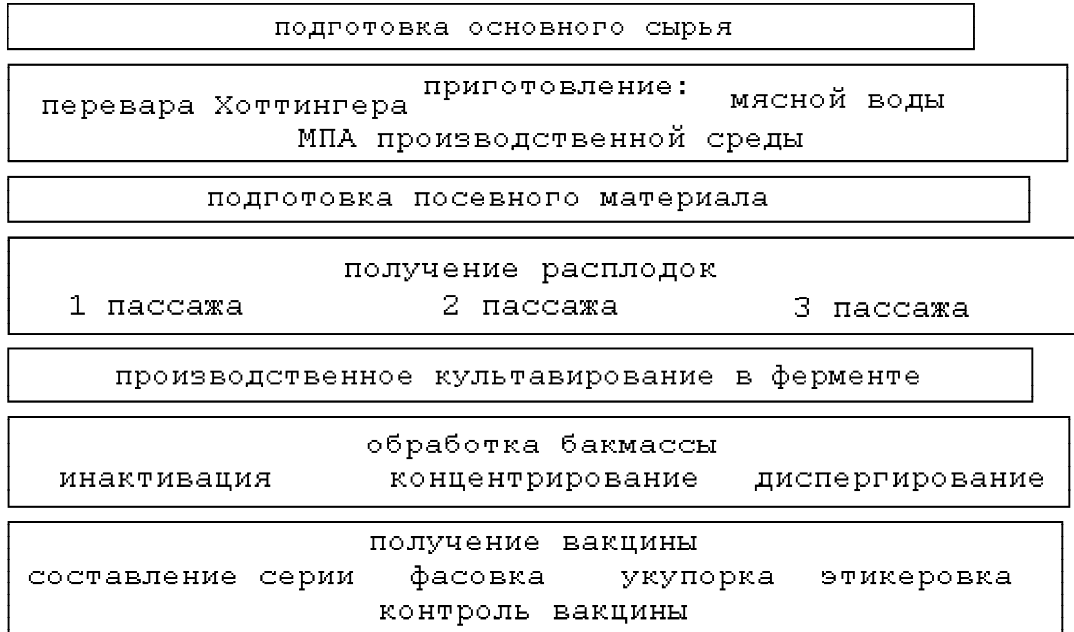
Для сравнения антигенной активности и специфичности штаммов, используемых в вакцине, проводят перекрестные серологические реакции с гомологичными и гетерологичными сыворотками, полученными на кроликах. При постановке реакции агглютинации на кроликах /РА/ кроличьи сыворотки с предельным титром /1:3200/ разводят формализованным 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 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. Бивалентную инактивированную вакцину против вибриоза рыб, содержащую смесь суспензий микробных клеток культур штамма *Vibrio anguillarum* №2 и ВУР-19, взятых в равном соотношении с концентрацией 80-100 млрд микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды, инактивированных 0,5% раствором формалина, готовят по технологической схеме табл.1. Готовую вакцину применяли в рыбноводном хозяйстве, неблагополучном по вибриозу форели, в целях профилактики. Иммунизации подверглась рыба массой более 1 г. Перед вакцинацией подготовили емкости, температура воды не ниже 8°C. Вакцину суспендируют в чистой воде с таким расчетом, чтобы ее конечная концентрация составляла 200 млн микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> и объем готовой суспензии не менее 10 л. Готовая суспензия вакцины должна быть использована в течение 3 ч. Рыбу отлавливают сачком из водоема и погружают в бассейн с суспензией вакцины, выдерживают в течение 20 секунд, после чего выпускают в подготовленные емкости. Температура воды должна быть идентична той, в которой рыба находилась до вакцинации. Иммунитет наступает у вакцинированных рыб через 14 дней, длительность иммунитета 12 месяцев.

Пример 2. Бивалентную инактивированную вакцину против вибриоза рыб, содержащую смесь суспензий микробных клеток культур штамма *Vibrio anguillarum* №2 и ВУР-19, взятых в равном соотношении с концентрацией 80-100 млрд микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды, инактивированных 0,5% раствором формалина, готовят по технологической схеме табл.1. Готовую вакцину применяли в рыбноводном хозяйстве, неблагополучном по вибриозу форели, с лечебной целью. Иммунизацией подверглась рыба массой более 5 кг. Перед вакцинацией подготовили бассейн, температура воды не

ниже 8°C. Вакцину суспендируют в чистой воде с таким расчетом, чтобы ее конечная концентрация составляла 200 млн микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> и объем готовой суспензии не менее 10 л. Готовая суспензия вакцины должна быть использована в течение 3 ч. Рыбу отлавливают сачком из водоема и погружают в емкость с суспензией вакцины, выдерживают в течении 30 секунд, после чего выпускают в подготовленные емкости. Температура воды должна быть идентична той, в которой рыба находилась до вакцинации. Лечебный эффект наступил через 2 суток, краснота покрова исчезла, гемморрагии в радужной оболчке глаз не увеличивались и не появлялись вновь, уменьшились очаги некроза на боковых поверхностях тела рыб. При этом иммунитет наступил у вакцинированных рыб через 14 дней и длился в течение 12 месяцев.

Технологическая схема производства бивалентной вакцины



Формула изобретения

Инактивированная вакцина против вибриоза рыб, содержащая инактивированную формалином смесь суспензий микробных клеток штаммов *Vibrio anguillarum*, отличающаяся тем, что содержит смесь суспензий микробных клеток штамма *Vibrio anguillarum* №2 и штамма *Vibrio anguillarum* VUR-19, взятых в равном соотношении с концентрацией 80-100 млрд микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> питательной среды.