



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010122828/10, 07.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.06.2010

(45) Опубликовано: 20.10.2011 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Временная инструкция по изготовлению и контролю бактериина против аэромоноза (бактериальной геморрагической септицемии) рыб**, 31.05.2005. SU 1839458 A1, 27.04.1996. RU 2080874 C1, 10.06.1997. SMIRNOV LP et al. Cytoplasmic protein vaccine against bacterial hemorrhagic septicemia (aeromonosis) of fish, Priki Biokhim Mikrobiol., 2000 Sep - Oct, Vol.36, No.5, p.592-596.

Адрес для переписки:

141142, Московская обл., Щелковский р-н,  
п/о Кашинцево, пос. Биокомбината,  
ВНИТИБП

(72) Автор(ы):

Самуйленко Анатолий Яковлевич (RU),  
Школьников Ефим Эмануилович (RU),  
Раевский Александр Андреевич (RU),  
Гринь Светлана Анатольевна (RU),  
Анисимова Любовь Викторовна (RU),  
Коротеева Людмила Александровна (RU),  
Коломнина Галина Федоровна (RU),  
Юхименко Людмила Николаевна (RU),  
Климов Антон Викторович (RU),  
Еремец Владимир Иванович (RU),  
Беро Иван Леонтьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение  
Всероссийский научно-исследовательский и  
технологический институт биологической  
промышленности (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ АЭРОМОНОЗА РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и касается способа изготовления вакцины против аэромоноза рыб. Представленный способ включает засев вакцинного штамма *Aeromonas sobria*, его культивирование с последующей инаktivацией, причем культивирование аэромонад проводят в жидкой питательной среде на основе перевара Хоттингера в ферментере в течение 4-6 часов при температуре  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , сразу после засева окислительно-восстановительный потенциал

культуральной жидкости снижают до (-40)-(-100) мВ, после чего до окончания процесса культивирования  $pO_2$  в культуральной жидкости поддерживают на уровне 20-30% от насыщения кислородом воздуха, рН культуральной жидкости регулируют на уровне 7,1-7,3 ед. рН, а дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации 0,25-0,35% при лимитировании роста аэромонад глюкозой. Способ позволяет повысить выход вакцины при сокращении времени ее производства. 4 табл.

RU 2 431 664 C1

RU 2 431 664 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 431 664** (13) **C1**

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*A61K 39/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010122828/10, 07.06.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**07.06.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **07.06.2010**

(45) Date of publication: **20.10.2011 Bull. 29**

Mail address:

**141142, Moskovskaja obl., Shchelkovskij r-n, p/o  
Kashintsevo, pos. Biokombinata, VNITIBP**

(72) Inventor(s):

**Samujlenko Anatolij Jakovlevich (RU),  
Shkol'nikov Efim Ehmanuilovich (RU),  
Raevskij Aleksandr Andreevich (RU),  
Grin' Svetlana Anatol'evna (RU),  
Anisimova Ljubov' Viktorovna (RU),  
Koroteeva Ljudmila Aleksandrovna (RU),  
Kolomnina Galina Fedorovna (RU),  
Jukhimenko Ljudmila Nikolaevna (RU),  
Klimov Anton Viktorovich (RU),  
Eremets Vladimir Ivanovich (RU),  
Bero Ivan Leont'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie  
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij i  
tehnologicheskij institut biologicheskij  
promyshlennosti (RU)**

(54) **METHOD FOR PREPARING FISH AEROMONOSIS VACCINE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves *Aeromonas sobria* vaccine strain seeding, cultivation and inactivation. *Aeromonads* are cultivated in a liquid nutrient medium of a Hottinger broth in a fermenter for 4-6 hours at temperature  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , immediately after seeding, an oxidation-reduction potential of the cultural liquid is reduced to (-40) - (-100) mV. Thereafter, before termination of a cultivation

process,  $\text{pO}_2$  in the cultural fluid is kept at 20-30 % from air oxygen saturation, pH of the cultural fluid is regulated at 7.1-7.3 pH units, and fractional glucose supply is carried out in doses to the concentration 0.25-0.35 % with glucose limitation of aeromonad growth.

EFFECT: method allows higher yield of the vaccine with reduced time of preparation.

4 tbl, 5 ex

R U 2 4 3 1 6 6 4 C 1

R U 2 4 3 1 6 6 4 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для промышленного получения вакцины для профилактики аэромоноза рыб.

Известен способ изготовления бактериина против аэромоноза рыб (1).

Культивирование вакцинного штамма *Aeromonas sobria* (2) проводилось на плотной питательной среде.

Однако способ культивирования аэромонад на плотных питательных средах является нетехнологичным, малопродуктивным, в силу чего не пригодным для промышленного получения вакцины.

Известен также способ изготовления химической вакцины ВЮС-2 (3), однако указанная вакцина предназначена для инъекционного способа введения, а сам способ длителен, трудоемок и экономически нецелесообразен.

Технический результат заявляемого изобретения состоит в повышении выхода целевого продукта, сокращении длительности его производства и упрощении способа.

Эта цель достигается осуществлением управляемого периодического процесса культивирования вакцинного штамма *Aeromonas sobria* в жидкой питательной среде.

Способ осуществляется следующим образом.

Для культивирования аэромонад используют жидкую питательную среду на основе перевара Хоттингера с ростовыми добавками.

Среду засевают культурой аэромонад (*Aeromonas sobria*), выращенной в жидкой питательной среде аналогичного состава. Культивируют при температуре (+25)-(+27)°С в течение 4-6 часов.

После засева ферментера окислительно-восстановительный потенциал (еН) культуральной жидкости снижают до (-40)-(-100) мВ, после чего до окончания процесса культивирования поддерживают рО<sub>2</sub> в культуральной жидкости на уровне 20-30% от насыщения кислородом воздуха, рН культуральной жидкости регулируют на уровне 7,1-7,3 ед. рН, а дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации 0,25-0,35% при лимитировании роста аэромонад глюкозой, характеризующемся резким повышением рО<sub>2</sub> при неизменных расходе воздуха и оборотах мешалки и прекращением снижения рН культуральной жидкости (табл. 1).

Технологические параметры периодического процесса культивирования аэромонад									
№ №	Значения параметров	Время культивирования, ч	Температура, °С	рН, ед.	еН, мВ	рО <sub>2</sub> , %	Кол-во глюкозы, %	Накопление, млрд/см <sup>3</sup>	ТАА
1	<min	3	24	7,0	-10	15	0,20	16	1:1024
2	min	4	25	7,1	-40	20	0,25	19	1:1024
3	opt	5	26	7,2	-70	25	0,30	22	1:1024
4	max	6	27	7,3	-100	30	0,35	25	1:1024
5	>max	7	28	7,4	-130	35	0,40	28	1:256

ТАА - титр агглютинирующих антител к антигену *A. sobria* в сыворотке вакцинированных рыб.

Пример 1.

Способ изготовления вакцины со значениями ниже минимальных параметров культивирования

еН культуральной жидкости снижают до (-10) мВ; рО<sub>2</sub> поддерживают на уровне 15%; рН в культуральной жидкости регулируют на уровне 7,0; дробная подача глюкозы осуществляется дозами до концентрации 0,2%.

Культивирование при 24°С в течение 3-х часов.

Накопление - 16 млрд/см<sup>3</sup>

ТАА - 1:1024.

Пример 2.

5 Способ изготовления вакцины с минимальными значениями параметров культивирования

еН культуральной жидкости снижают до (-40) мВ; рО<sub>2</sub> поддерживают на уровне 20%; рН в культуральной жидкости регулируют на уровне 7,1; дробная подача глюкозы осуществляется дозами до концентрации 0,25%.

10 Культивирование при 25°C в течение 4 часов.

Накопление - 19 млрд/см<sup>3</sup>.

ТАА - 1:1024.

15 Пример 3. Способ изготовления вакцины с оптимальными значениями параметров культивирования

еН культуральной жидкости снижают до (-70) мВ; рО<sub>2</sub> поддерживают на уровне 25%; рН в культуральной жидкости регулируют на уровне 7,2; дробная подача глюкозы осуществляется дозами до концентрации 0,3%.

Культивирование при 26°C в течение 5 часов.

20 Накопление - 22 млрд/см<sup>3</sup>.

ТАА - 1:1024.

Пример 4.

25 Способ изготовления вакцины с максимальными значениями параметров культивирования

еН культуральной жидкости снижают до (-100) мВ; рО<sub>2</sub> поддерживают на уровне 30%; рН в культуральной жидкости регулируют на уровне 7,3; дробная подача глюкозы осуществляется дозами до концентрации 0,35%.

Культивирование при 27°C в течение 6 часов.

30 Накопление - 25 млрд/см<sup>3</sup>.

ТАА - 1:1024.

Пример 5.

35 Способ изготовления вакцины со значениями выше максимальных параметров культивирования

еН культуральной жидкости снижают до (-130) мВ; рО<sub>2</sub> поддерживают на уровне 35%; рН культуральной жидкости регулируют на уровне 7,4; дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации 0,4%.

Культивирование при 28°C в течение 7 часов.

40 Накопление - 28 млрд/см<sup>3</sup>.

ТАА - 1:256.

45 Таким образом, параметры культивирования в примерах 2-4 позволяют за короткое время культивирования (4-6 часов) получать наибольшее количество жизнеспособных (полноценных в антигенном отношении) клеток - 19-25 млрд/см<sup>3</sup>. Титр агглютинирующих антител (ТАА) к антигену *Aeromonas sobria* в сыворотке вакцинированных рыб составляет 1:1024.

50 Способ, параметры которого изложены в примере 1, экономически нецелесообразен из-за низкого накопления аэромонад, тогда как способ, приведенный в примере 5, неприемлем по причине низкой активности вакцины ТАА - 1:256.

Сравнительная оценка известного способа культивирования с заявляемым представлена в табл.2.

Таблица 2		
Показатели процесса культивирования	Питательная среда	
	жидкая	плотная (эритрит-агар) прототип
Выход клеток с 1 л пит. среды (млрд)	19000-25000	4000
5 Время культивирования (ч)	4-6	18-20
Дополнительные стадии получения бакмассы		1. Застывание агара 2. Смыв культуры с агара
Для получения 80 л бакмассы с концентрацией микробных клеток 20 млрд/см <sup>3</sup> необходимо:		
10 - емкость для культивирования;	Ферментер, емк. 100 л	Матрас стеклянный, емк. 1 л
- количество емкостей (шт.);	1	1467
- количество питательной среды (л)	80	440

Предложенный способ в отличие от известного обладает следующими преимуществами:

- 15 1. Увеличивает выход микробных клеток с 1 л питательной среды более чем в 5 раз;
2. Сокращает время культивирования более, чем в 3,5 раза;
3. В технологии получения бакмассы исключаются стадии - застывание агара и смыв микробных клеток с агара;
4. Более прост в исполнении и менее трудоемок: 1 ферментер емкостью 100 л
- 20 заменяет 1467 стеклянных матрасов емкостью 1 л;
5. Позволяет получать стандартную культуру в больших объемах за короткий срок;
6. Экономически более целесообразен, что вытекает из пунктов 1-5.

25 Вакцина, приготовленная по предлагаемому способу, безвредна и обладает высокой иммуногенной активностью (табл.3).

Таблица 3					
Группа	Уровень контаминации, % от общего числа рыб			БАСК	ТАА
	нет роста	единичный	умеренный		
30 I	94,4	5,6	0	53,2±3,2	1:256-1:1024
II	100,0	0	0	67,6±8,8	1:512-1:2048
K	0	20,0	80,0	19,2±6,7	1:2-1:32

I и II - группы рыб, вакцинированные разными сериями вакцины;

35 K - контрольная группа (невакцинированные рыбы);

БАСК - бактерицидная активность сыворотки крови рыб;

ТАА - титр агглютинирующих антител к антигену A.sobria в сыворотке.

Вакцина, приготовленная по предлагаемому способу, по иммуногенной активности не уступает химической вакцине ВЮС-2.

40 Результаты вакцинации карпа представлены в табл.4.

Таблица 4	
Иммуногенная активность	
Вакцина, приготовленная по заявляемому способу	Вакцина ВЮС-2
45 94,4-100%	80-96,7%

При одинаковых качественных показателях (активность, безвредность) вакцина, приготовленная по предлагаемому способу, в отличие от вакцины ВЮС-2, обладает следующими преимуществами: во-первых, изготавливается по экономичной

50 технологии, легко воспроизводимой в промышленных условиях; во-вторых, при ее применении исключается инъекционный способ введения.

Источники информации

1. Временная инструкция по изготовлению и контролю бактериина против

аэромоноза (бактериальной геморрагической септицемии) рыб, утв. 31.05.05 г. (прототип).

2. Авт. св. СССР №1839458 А1, С12 №1/20, А61К 39/02, 27.04.1996 г.

3. Патент РФ №2080874 С1, А61К 39/02, 10.06.1997.

5

#### Формула изобретения

Способ изготовления вакцины против аэромоноза рыб, включающий засев  
вакцинного штамма *Aeromonas sobria*, его культивирование с последующей  
10 инактивацией, отличающийся тем, что культивирование аэромонад проводят в жидкой  
питательной среде на основе перевара Хоттингера в ферментере в течение 4-6 ч при  
температуре  $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ , сразу после засева окислительно-восстановительный потенциал  
культуральной жидкости снижают до  $(-40) - (-100)$  мВ, после чего до окончания  
15 процесса культивирования  $p\text{O}_2$  в культуральной жидкости поддерживают на  
уровне 20-30% от насыщения кислородом воздуха, рН культуральной жидкости  
регулируют на уровне 7,1-7,3 ед. рН, а дробную подачу глюкозы осуществляют  
дозами до концентрации 0,25-0,35% при лимитировании роста аэромонад глюкозой.

20

25

30

35

40

45

50