



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 6053
(51) C12N 1/20 (2006/01)
C12N 3/00 (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0027.2

(22) 09.01.2021

(45) 06.05.2021, бюл. №18

(72) Сериккалиева Томирис Сериккаликызы; Хусаинов Дамир Микдатович; Ахметсадыков Нурлан Нурулдинович; Смирнова Мануэла Сергеевна; Уточкина Юлия Владимировна; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Толымбекова Айжамал Бериковна; Асқар Айгерім Айдарханкызы; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Алиев Абай Канатович; Жантелиева Лаура Оразақыновна; Алимгазина Сабира Байжановна; Муслимова Жадыра Умирбеккызы; Орынханов Канат Аманжолович; Баймирзаев Бекзат Қайратұлы; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Ибажанова Асем Сериковна; Мухпулова Гузалай Алимжановна; Капыш Михаил Андреевич; Кулатаев Бейбит Турганбекович

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный университет»

(56) Ветеринарные препараты: Справочник/ Под редакцией Д.Ф. Осидзе. - М.: Колос, 1981, с.276.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЭМФИЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ОВЕЦ

(57) Полезная модель относится к ветеринарной биотехнологии, в частности к получению вакцинных препаратов, и может быть использована при получении вакцины эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец.

Задачей полезной модели является повышение производительности и снижение себестоимости вакцины.

Техническим результатом является разработка более эффективного способа получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец.

Задача достигается тем, что в предлагаемом способе получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец культивирование осуществляют в биологическом реакторе с использованием разработанной нами споруляционно -ростовой среды следующего состава: панкреатический гидролизат сердечной мышечной ткани крупного рогатого скота, панкреатический гидролизат гороха, экстракт куриной печени, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт сухой, пептон ферментативный сухой, глюкоза, L-аргинин, тиамин, пиридоксин, пируват натрия, сукцинат натрия, калий азотнокислый, кальций хлористый, магний серноокислый, однозамещенный фосфорно-кислый калий, двузамещенный фосфорно-кислый натрий, железо серноокисное, кобальт хлористый, цинк серноокислый, медь серноокислая, натрий хлористый, пропинол Б-400, вода деминерализованная.

Использование предлагаемой питательной среды и глубинного культивирования производственного штамма в биореакторах позволяет значительно снизить трудоемкость производства вакцины и повысить ее выход.

(19) KZ (13) U (11) 6053

Полезная модель относится к ветеринарной биотехнологии, в частности к получению вакцинных препаратов, и может быть использована при получении вакцины эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец.

Известен способ получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец, включающий приготовление питательной среды, ее стерилизацию, выращивание культуры производственного штамма эмфизематозного карбункула, инактивацию культуры, концентрирование бактериальной массы, разлив, укупорку и этикетирование вакцины (Ветеринарные препараты: Справочник/ Под редакцией Д.Ф. Осидзе. - М.: Колос, 1981.- С. 276).

Недостатком существующего способа является его большая трудоемкость и низкий выход вакцины.

Задачей полезной модели является повышение производительности и снижение себестоимости вакцины.

Техническим результатом является разработка более эффективного способа получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец.

Задача достигается тем, что в предлагаемом способе получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец культивирование осуществляют в биологическом реакторе с использованием разработанной нами споруляционно -ростовой среды следующего состава (мас.%):

Панкреатический гидролизат сердечной мышечной ткани крупного рогатого скота 10,0-15,0

Панкреатический гидролизат гороха 10,0-15,0

Экстракт куриной печени 5,0 - 10,0

Панкреатический гидролизат казеина 1,0-2,0

Дрожжевой экстракт сухой 0,1-0,15

Пептон ферментативный сухой 0,1-0,15

Глюкоза 0,1-0,3

L-аргинин 0,005-0,01

Тиамин 0,0002-0,0003

Пиридоксин 0,0002-0,0003

Пируват натрия 0,00005-0,0001

Сукцинат натрия 0,00005-0,0001

Калий азотнокислый - 0,001-0,002

Кальций хлористый - 0,001-0,002

Магний сернокислый - 0,001-0,002

Однозамещенный фосфорно-кислый калий- 0,001-0,002

Двухзамещенный фосфорно-кислый натрий- 0,005-0,01

Железо сернокислое - 0,00005-0,0001

Кобальт хлористый - 0,01-0,015

Цинк сернокислый 0,0005-0,001

Медь сернокислая 0,0005-0,001

Натрий хлористый 0,05-0,1

Пропинол Б-400 0,05-0,1

Вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) - до 100%, глубинное культивирование производственного штамма *Clostridium chauvoei* в биореакторах в течение 20-22 ч при температуре 36,5 ± 0,5°C, рН 7,6-7,8, перемешивание при 1200-1500 об/мин, с последующей инактивацией и концентрированием

бактериальной, разливом, укупоркой и этикетированием вакцины.

Использование предлагаемой питательной среды и глубинного культивирования производственного штамма в биореакторах позволяет значительно снизить трудоемкость производства вакцины и повысить ее выход.

Обобщенные сравнительные данные существующего и предлагаемого способов изготовления вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота приведены в таблице 1.

Пример 1

Технологический процесс предлагаемого способа осуществляется следующим образом.

В качестве исходного материала для засева используют матровую культуру производственного штамма *Clostridium Chauvoei*. В среду, предназначенную для раскладки культур, добавляют 0,2% глюкозы. Необходимо, чтобы среда перед посевом была теплой (37- 39°C).

Далее эту культуру производственного штамма *Clostridium Chauvoei* вносят в биореактор с предлагаемой питательной средой из расчета 2 -4 литра на каждые 100 литров бульона.

Затем питательную среду стерилизуют при 134°C в течение 1 ч и охлаждают до 35-37°C. Далее реактор с питательной средой засеивается культурой штамма *Clostridium chauvoei*. Культивирование осуществляют в течение 20-22 ч в биореакторе при следующих значениях основных параметров: температуре 36,5 ± 0,5°C, рН 7,8-8,0, перемешивание при 1200-1500 об/мин.

При использовании указанных параметров среды сокращается время выращивания, повышается выход бактерий (концентрация микробных клеток в 1 мл около 8 млрд. клеток, против 4 млрд.), снижается стоимость питательной среды.

При установлении типичной для *Clostridium Chauvoei* морфологии и отсутствии посторонней микрофлоры в культуру добавляют 0,5-0,7% химически чистого формалина (ГОСТ 1625-76) с содержанием формальдегида не ниже 36% в пересчете к 37% содержанию.

Формализированную культуру выдерживают при температуре 30-39°C в течение 3-5 суток. В течение этого срока культуру перемешивают 2-3 раза. По истечении указанного срока для проверки на стерильность производят высевы на МПА, МПБ, МППБ и микроскопию мазков, окрашенных по Граму. Наблюдение за посевами ведется в течение 3 -х суток. Все посеvy должны оставаться стерильными, в мазках отсутствовать посторонние микроорганизмы.

В реакторе с формализированной культурой, после определения ее стерильности, устанавливают рН 7,2-7,4 10%-ным раствором едкого натра, после чего добавляют стерильный 3%-ный гель гидрата окиси алюминия (ГОСТ 18287-72) в количестве 15% к общему объему культуры и перемешивают, включая мешалку каждые 2 часа в течение первых 10 часов сорбции. Затем отключают подогрев и вакцину оставляют при комнатной температуре на

2-3 суток до полного просветления надосадочной жидкости.

При концентрации микробных клеток в пределах 8 млрд. вакцина требует концентрации на 20%, при концентрации 7 млрд. препарат концентрируют на 30%, 6 млрд. - на 40%, 5 млрд. - на 50%. К оставшейся части стерильно при постоянном перемешивании добавляют расплавленный агар-агар из расчета 50 г сухого агара на 100 литров вакцины. После этого рН вакцины доводят до 7,4-7,6 двунормальным раствором едкого натра и проверяют на стерильность путем посева на МППБ. МПА, МПБ. Наблюдение за посевами ведут в течение 3-х суток. Посевы должны оставаться стерильными.

Пример 2.

Иммуногенные свойства каждой серии вакцины проверяли путем вакцинации 10 морских свинок массой 350-450 г в дозе 0,4 мл. Вакцину вводили подкожно в области брюшных мышц. Через 18-20 суток 10 вакцинированных свинок и 10 контрольных заражали сухой споровой культурой

штамма Р15 в объеме 0,1 мл в разведении 1:10, что составляет 20

ЛД50. Споровую культуру вводили внутримышечно в смеси с 0,2 мл 10%- ного раствора хлористого кальция, предназначенного для внутривенного введения.

Споровую культуру биопредприятиям рассылает специализированное учреждение Республики Казахстан. Ампулы со споровой культурой хранятся в холодильнике при температуре 4-6°С. Для испытания иммуногенных свойств вакцины используют не менее трех ампул. В каждую ампулу вносят 1 мл стерильного физиологического раствора. После полного растворения содержимое ампул переносят в пробирку, которую выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа. Для заражения опытных и контрольных морских свинок можно использовать предварительно подтитрованную суточную культуру штамма Р15.

Результаты опыта, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о высоких защитных свойствах заявленной вакцины.

Таблица 1

Сравнительные данные по способам изготовления вакцины против эмфизематозного карбункула

Существующий способ		Предлагаемый способ	
1		2	
По составу питательной среды			
Перевар Хоттингера	30	Панкреатический гидролизат сердечной мышечной ткани крупного рогатого скота	10,0-15,0
Печеночный экстракт	30	Панкреатический гидролизат гороха	10,0-15,
Гидролизат казеина	30	Экстракт куриной печени	5,0 - 10,0
Пептон	0,5	Панкреатический гидролизат казеина	1,0-2,0
Натрий хлористый	0,2	Дрожжевой экстракт сухой	0,1-0,15
Глюкоза	0,2	Пептон ферментативный сухой	0,1-0,15
Дистиллированная вода	до 100 мас%	Глюкоза	0,1-0,3
		L-аргинин	0,005-0,01
		Тиамин	0,0002-0,0003
		Пиридоксин	0,0002-0,0003
		Пируват натрия	000005-0,0001
		Сукцинат натрия	000005-0,0001
		Калий азотнокислый	0,001-0,002
		Кальций хлористый	0,001-0,002
		Магний сернокислый	0,001-0,002
		Однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,001-0,002
		Двухзамещенный фосфорно-кислый натрий	0,005-0,01
		Железо сернокислое	0,00005-0,0001
		Кобальт хлористый	0,01-0,015
		Цинк сернокислый	0,0005-0,001
		Медь сернокислая	0,0005-0,001

	Натрий хлористый Пропинол Б-400 Дистиллированная вода	0,5-0,1 0,05-0,1 до 100 мас%
1	2	
Время выращивания		
36 часов	20 часов	
Количество доз с 1л питательной среды		
2 тыс доз	8 тыс. доз	

Таблица 2

Иммуногенные свойства предлагаемой вакцины в сравнении с коммерческой

Вид животных	Вакцина	Заразили	Заболело, пало	Здоровы
Морские свинки	Заявленная	10	-	10
Морские свинки	Коммерческая	10	-	10
Морские свинки	Контрольная	10	10	10

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ получения вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец, включающий приготовление питательной среды, ее стерилизацию, выращивание культуры производственного штамма эмфизематозного карбункула, инактивацию культуры, концентрирование бактериальной массы, разлив, укупку и этикетирование вакцины, **отличающийся** тем, что в питательную среду дополнительно вносят панкреатический гидролизат сердечной мышечной ткани крупного рогатого скота, панкреатический гидролизат гороха, экстракт куриной печени, дрожжевой экстракт сухой, L-аргинин, тиамин, пиридоксин, пируват натрия, сукцинат натрия, калий азотнокислый, кальций хлористый, магний сернокислый, однозамещенный фосфорно-кислый калий, двузамещенный фосфорно-кислый натрий, железо сернокислое, кобальт хлористый, цинк сернокислый, медь сернокислая, пропинол Б-400, при следующем соотношении компонентов, мас%:

панкреатический гидролизат сердечной мышечной ткани крупного рогатого скота	10,0-15,0
панкреатический гидролизат гороха	10,0-15,0
экстракт куриной печени	5,0 - 10,0
панкреатический гидролизат казеина	1,0-2,0
дрожжевой экстракт сухой	0,1-0,15

пептон ферментативный сухой	0,1-0,15
глюкоза	0,1-0,3
L-аргинин	0,005-0,01
тиамин	0,0002-
0,0003	
пиридоксин	0,0002-
0,0003	
пируват натрия	0,00005-
0,0001	
сукцинат натрия	0,00005-
0,0001	
калий азотнокислый	0,001-0,002
кальций хлористый	0,001-0,002
магний сернокислый	0,001-0,002
однозамещенный фосфорно-кислый калий	0,001-0,002
двузамещенный фосфорно-кислый натрий	0,005-0,01
0,0001	
железо сернокислое	0,00005-
0,0001	
кобальт хлористый	0,01-0,015
цинк сернокислый	0,0005-0,001
медь сернокислая	0,0005-0,001
натрий хлористый	0,05-0,1
пропинол Б-400	0,05-0,1
вода деминерализованная (рН 7,2±0,2) до 100%, культивирование проводят в биореакторах при температуре 36,5±0,5°C, рН 7,8-8,0, перемешивание при 1200-1500 об/мин.	

Верстка Ф. Сопакова
Корректор Г. Косанова