



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 7834  
(51) A61K 39/116 (2006.01)  
A61K 39/08 (2006.01)  
C12N 1/20 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

## ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2022/0979.2

(22) 08.11.2022

(45) 24.02.2023, бюл. №8

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Исраилович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Даниярұлы Дарын; Нұрғазы Бану Өміртайқызы; Ахметжанова Молдир Нурлановна; Махмутов Абзал Касенович; Алиев Абай Канатович; Сабырбекова Шынар Касеновна; Базарбаев Рыскелди Канторевич; Майхин Кыдырбай Тажибаевич; Ахметова Гульнази Даулетхановна; Ибажанова Асем Сериковна; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Мухпулова Гузалай Алимжановна; Несипбаева Айгуль Кадировна; Ержанқызы Акерке; Базилбаев Сакен Мухатаевич; Бердалина Акнур Жакыпгереевна; Аманқосова Гаухар Маратқызы; Кұлбек Санжар Маратұлы; Куттымуратова Куралай Бисеновна; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Кулатаев Бейбит Турганбекович; Абжалиева Аида Болатбековна

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

(56) KZ 16260 В, 15.12.2009

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БРАДЗОТА, ИНФЕКЦИОННОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ, ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО ОТЕКА ОВЕЦ И ДИЗЕНТЕРИИ ЯГНЯТ**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарной микробиологии и биотехнологии, в

частности к технологии изготовления вакцинных препаратов, и может быть использовано при производстве поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят.

Техническим результатом является снижение себестоимости способа, повышение выхода вакцины.

Способ изготовления поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, включающий культивирование штаммов *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типов В, С и Д на жидкой питательной среде, содержащей, мас %: панкреатический гидролизат сердца овец 5,0-10,0, панкреатический гидролизат печени овец 5,0-10,0, перевар Хоттингера 5,0-10,0, печеночный экстракт 5,0-10,0, панкреатический гидролизат казеина 1,0-2,0, пептон 1,0-2,0, тиамин 0,0002-0,0003, L- цистеин 0,00005-0,0001, L-аргинин 0,00005-0,0001, кальций хлористый 0,001-0,002, магний серноокислый 0,001-0,002, железо серноокисное 0,0005-0,001, кобальт хлористый 0,001-0,015, цинк серноокислый 0,0005-0,001, медь серноокислая 0,0005-0,001, натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,008-0,01, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,006-0,008, глюкоза 10,0-15,0, вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) - остальное, обработку формалином, концентрирование, составление серии смешиванием анакультур, добавление адьюванта, расфасовку вакцины.

(19) KZ (13) U (11) 7834

Полезная модель относится к области ветеринарной микробиологии и биотехнологии, в частности к технологии изготовления вакцинных препаратов, и может быть использовано при производстве поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят.

Известен способ получения поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, включающий культивирование штаммов *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типов В, С и Д на жидкой питательной среде, обработку формалином, концентрирование, смешиванием анакультур и расфасовку, при этом питательная среда содержит перевар Хоттингера, гидролизат гороха и сои, печеночный экстракт, гидролизат казеина, пептон, сухой дрожжевой экстракт, натрий хлористый, твин 80, однозамещенный фосфатно-кислый калий, двузамещенный фосфатно-кислый натрий, глюкозу, L-аргинин, пропионил Б-400, кальций хлористый, магний сернокислый, цинк сернокислый, медь сернокислая, железо сернокислое, а вакцину обогащают анатоксином из клостридий *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типов В, С и Д, [Патент КЗ № 16260 «Способ получения поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят». МПК А61К 39/116 (2006.01), А61К 39/08 (2006.01), С12N 1/20 (2006.01). 15.12.2009, бюл. № 12].

Недостатком существующего способа является то, что получаемый по нему препарат не обеспечивает полной защиты животных от клостридиозов, обладает слабыми антигенными и иммуногенными свойствами, обладает высокой себестоимостью и низким выходом вакцины.

Задачей изобретения является снижение себестоимости способа, повышение выхода вакцины.

Техническим результатом является снижение себестоимости способа, повышение выхода вакцины.

Задача достигается путем введения в питательную среду недорогих источников азота, микроэлементов, аминокислот.

Способ изготовления поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, включающий культивирование штаммов *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типов В, С и Д на жидкой питательной среде, содержащей, мас%: панкреатический гидролизат сердца овец 5,0-10,0, панкреатический гидролизат печени овец - 5,0-10,0, перевар Хоттингера 5,0-10,0, печеночный экстракт 5,0-10,0, панкреатический гидролизат казеина 1,0-2,0, пептон 1,0-2,0, тиамин 0,0002-0,0003, L- цистеин - 0,00005-0,0001, L-аргинин - 0,00005-0,0001, кальций хлористый - 0,001-0,002, магний сернокислый - 0,001-0,002, железо сернокислое - 0,0005-0,001,

кобальт хлористый 0,001-0,015, цинк сернокислый 0,0005-0,001, медь сернокислая 0,0005-0,001, натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,008-0,01, калий фосфорнокислый однозамещенный 0,006-0,008, глюкоза 10,0-15,0, вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) - остальное, обработку формалином, концентрирование, составление серии смешиванием анакультур, добавление адьюванта, расфасовку вакцины.

Способ осуществляется следующим образом.

1. Для приготовления вакцины используют питательную среду следующего состава. Состав жидкой споруляционно-ростовой среды, мас. %:

панкреатический гидролизат сердца овец	10,0-20,0
панкреатический гидролизат печени овец	10,0-20,0
перевар Хоттингера	10,0-20,0
печеночный экстракт	10,0-20,0
панкреатический гидролизат казеина	1,0-2,0
пептон	1,0-2,0
тиамин	0,0002-0,0003
L- цистеин	0,00005-0,0001
L-аргинин	0,00005-0,0001
кальций хлористый	0,001-0,002
магний сернокислый	0,001-0,002
железо сернокислое	0,0005-0,001
кобальт хлористый	0,001-0,015
цинк сернокислый	0,0005-0,001
медь сернокислая	0,0005-0,001
натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,008-0,01

калий фосфорнокислый однозамещенный	0,006-0,008
глюкоза	5,0-10,0

вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) остальное.

Питательную среду кипятят в течение 20-30 минут, фильтруют и разливают в бутылки по 8 л. На готовую среду наслаивают вазелиновое масло и стерилизуют при температуре 115-118°C в течение 45-50 минут, рН готовой среды составляет для *Clostridium perfringens* типа С, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium septicum* 7,8-8,0, а для *Clostridium perfringens* типа В и Д - 8,0-8,5.

2. Выращивание расплодов производственных штаммов.

Штаммы ежегодно получают из специализированного учреждения Республики Казахстан в двух дубликатах с соответствующими на них паспортами. Разрешается закупать штаммы в ВГНКИ ветпрепаратов (г. Москва) и зарубежных референс-центрах.

Каждым из данных штаммов, предварительно освеженных посевом в питательную среду из МППБ (мясо-пептонный печеночный бульон) под вазелиновым маслом, засевают бутылки с питательной средой. Перед засевом культуры (матры) в питательную среду добавляют 40-50% раствор стерильной глюкозы из расчета содержания в среде 0,5% сухого вещества. Засев производят в глубину питательной среды с температурой 37-38°C из расчета 10 мл культуры на литр среды. Засеянные культуры *Clostridium septicum* и *Clostridium oedematiens* для выращивания помещают в термостат при температуре 37-38°C на 18-20 часов,

культуры *Clostridium perfringens* В, С и Д - на 6-12 часов. После этого их проверяют на чистоту роста путем высевов на питательную среду из МПА (мясо-пептонный агар-агар), МПБ (мясо-пептонный бульон), МППБ под вазелиновым маслом и молоко, а также путем микроскопии мазков. При наличии типичной морфологии культур производят засев питательной среды в реакторах

3. Глубинное культивирование производственных штаммов.

Для культивирования и последующей обработки каждой культуры используют отдельный реактор. Стерилизацию питательной среды проводят при 118-120°C в течение 40-60 минут, pH среды после стерилизации - 7,4-7,6 определяют потенциометрически.

Химические показатели готовой питательной среды должны быть следующими: аминного азота-170±10 мг%, триптофана - 50-75 мг%, пептона - не ниже 3±0,5%.

После стерилизации среду быстро охлаждают до 50°C путем подачи холодной воды в рубашку реактора и оставляют для равномерного снижения температуры по всему объему реактора до 38-39°C. До посева культур в питательную среду добавляют 40-50 %-ный раствор стерильной глюкозы из расчета 0,5% сухого вещества. При посеве в реактор через посевную трубку вносят 2-4 литра активно растущей культуры на каждые 100 литров среды.

Культуры *Clostridium septicum* и *Clostridium oedematiens* выращивают в течение 18-24 часов при температуре 37-38°C. Культуру *Clostridium perfringens* типов «С», «В» выращивают в течение 48 часов, *Clostridium perfringens* типа «Д» - в течение 16-18 часов при температуре 37-38°C.

В процессе роста культур *Clostridium perfringens* типа «Д» производят подкормку их 40-50% раствором глюкозы из расчета 0,5% сухого вещества с предварительным подщелачиванием 10%-ным раствором едкого натра.

Для этого *Clostridium perfringens* типа «В» через 6-8 часов культивирования до pH 7,0-7,2, после чего добавляют глюкозу.

*Clostridium perfringens* типа «Д» подщелачивают два раза. Через 6-8 часов до pH 7,0-7,2 и через 14-16 до pH 7,8; после чего добавляют глюкозу (за 2 часа до окончания роста). В процессе роста производят микроскопию культур. В мазках должны быть палочки, типичные для *Clostridium perfringens*. Концентрация микробных тел должна быть в пределах 4-7 млрд. в 1 мл.

Культуру проверяют на чистоту роста путем посева на МППБ, МПА и МПБ. Культуры должны иметь чистый рост на МППБ и типичную морфологию при отсутствии роста в МПБ и на МПА.

4. Обработка культур формалином

Во всех культурах (кроме *Clostridium perfringens* типа Д) устанавливают pH 6,8-7,0 и добавляют 0,65% формалина с 37% содержанием формальдегида. К культуре *Clostridium septicum* добавляют 0,86% формалина.

В культуре *Clostridium perfringens* типа Д устанавливают pH 8,0-8,3. Затем в реактор с этой культурой добавляют стерильный раствор трипсина, культуру в реакторе хорошо перемешивают при температуре 37-38°C в течение 1,5-3 часов с периодическим перемешиванием содержимого реактора через каждые 30 минут. В реакторе с активированной культурой устанавливают pH 6,8-7,0 и добавляют 0,65% формалина, тщательно перемешивают мешалкой и выдерживают при температуре 37-38°C в течение 7-9 суток с ежедневным перемешиванием 2-3 раза в день.

По истечении указанного времени формализованные культуры проверяют на чистоту и стерильность и в реакторы с формализованными культурами *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типа Д добавляют коллоидный раствор гидроокиси алюминия в количестве 15-18% и 20% для *Clostridium perfringens* типа В или С. Содержимое всех реакторов тщательно перемешивают и оставляют при температуре 18-20°C в течение 2-5 суток до просветления надосадочной жидкости.

После просветления анакультур их концентрируют путем декантации прозрачной надосадочной жидкости в количестве 60% от общего объема анакультуры *Clostridium oedematiens*, 50% *Clostridium perfringens* типов В и Д. Культуру *Clostridium septicum* концентрируют до 50% первоначального объема, а в том случае, когда исходная концентрация микробных тел будет меньше 4 млрд. в 1 см<sup>3</sup>, надосадочную жидкость удаляют в количестве, необходимом для получения 8 млрд. клеток в 1 см<sup>3</sup> препарата. Концентрированные анакультуры используют для составления поливалентной концентрированной гидроокисьалюминиевой вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят.

5. Составление вакцины.

Для составления серии вакцины, концентрированные анакультуры смешивают в соотношении *Clostridium septicum* - 8%, *Clostridium oedematiens* - 8%, *Clostridium perfringens* типа В - 16%, типа С - 16%, типа Д 16%, полианатоксин - 16%.

К полученной смеси (температура 39°C) стерильно добавляют при постоянном перемешивании расплавленный 2,5%-ный агар-агар (в горячем виде) из расчета содержания в вакцине сухого агара-агара 0,1%. После этого pH вакцины доводят до 7,4-7,6%-ным раствором едкого натра или двууглекислой соды, вакцину тщательно перемешивают и расфасовывают.

Вакцину, расфасованную во флаконы, проверяют на стерильность путем посева на МППБ, МПБ и МПА во флаконах и пробирках, затем ее хранят при температуре +18, +20°C. Через 15 дней из флаконов первичного посева в МППБ делают, пересев на такие же среды. После этого ведут наблюдение за первичными и повторными посевами еще 5 дней. При условии стерильности вакцина передается на биологический контроль.

### 6. Биологический контроль

Иммуногенную активность вакцины проверяют на 20 кроликах массой 1,8-2,2 кг, которым двукратно внутримышечно с интервалом в 10-12 суток вводят вакцину по 1,5 см<sup>3</sup>. Через 18-20 суток после второй прививки животных по три кролика на каждую валентность заражают заранее подтитрованными культурами *Clostridium perfringens* типов В и С и пять кроликов культурой *Clostridium oedematiens*. Одновременно с вакцинированными заражают в тех же дозах контрольных (не вакцинированных) животных по два кролика на каждый штамм. Для проверки активности вакцины по отношению к *Clostridium perfringens* типа Д у трех кроликов через 18-20 суток после второго введения вакцины из сердца берут кровь. Сыворотки крови, полученные от каждого кролика, проверяют в реакции нейтрализации токсина на белых мышках массой 16-18 г по следующей методике: испытуемые сыворотки и токсин в дозе 1 ДЛМ смешивают в равных объемах и выдерживают 45 минут при температуре (37+1)°С, после чего смесь токсина и сыворотки крови каждого кролика вводят внутривенно в дозе 0,5 см<sup>3</sup> пяти белым мышам массой 16-18 г. Одновременно пяти белым мышам в дозе 0,25 см<sup>3</sup> внутривенно вводят токсин без сыворотки.

Вакцину выпускают при выживании всех вакцинированных кроликов в течение 6 суток, при гибели контрольных в течение 24-72 ч. Допускается гибель по одному вакцинированному кролику из групп, зараженных *Clostridium perfringens* типов В и С, и двух кроликов, зараженных *Clostridium oedematiens*. По отношению к *Clostridium perfringens* типа Д вакцину считают активной при выживании в течение суток не менее 10 мышей из 15 при гибели всех контрольных животных.

Иммуногенность вакцины по отношению к *Clostridium septicum* проверяют на 20 белых мышках массой 16-18 г. Десять животных иммунизируют испытуемой серией вакцины, которую вводят

двукратно подкожно в дозе 0,5 см<sup>3</sup> с интервалом 15-18 суток. Десять белых мышей оставляют в качестве контроля. Через 18-20 суток после второго введения препарата всех животных (вакцинированных и контрольных) заражают сухой тест-культурой *Clostridium septicum* 1098 в дозе 3-5 ЛД<sub>50</sub>. Учет результатов опыта проводят через 48 часов с момента заражения. Серию препарата считают активной по отношению к *Clostridium septicum*, если из 10 иммунизированных белых мышей после контрольного заражения выживает не менее 8 животных, а в контрольной группе погибает не менее 8 мышей. При гибели меньшего количества мышей в контрольной группе серию вакцины подвергают повторной проверке, а при выживании меньшего количества вакцинированных животных серию препарата перепроверяют в сравнении с сухим стандартом иммуногенности. Для этого 20 белых мышей массой 16-18 г иммунизируют сухим стандартным референс-препаратом и 20 животных прививают испытуемой серией вакцины,

Препараты вводят двукратно, подкожно с интервалом между инъекциями 15-18 суток. Реферанс- препарат вводят в дозах по 0,1 см<sup>3</sup>, а испытуемую серию - в дозах по 0,5 см. Через 18-20 суток после второго введения животных обеих групп и 10 контрольных мышей заражают сухой тест-культурой *Clostridium septicum* 1098 в дозе 3-5 ЛД<sub>50</sub>. Серию препарата считают пригодной для практического применения, если в группах животных, иммунизированных как референс-препаратом, так и испытуемой серией вакцины, выживает не менее 80% животных при гибели не менее 80% мышей в контрольной группе.

При неудовлетворительных результатах повторного контроля вакцину бракуют.

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

Таблица 1.

Сравнительные данные по способам изготовления поливалентной вакцины

Существующий способ		Предлагаемый способ	
По составу вакцины			
Гидролизат казеина	5,0-10,0	Панкреатический гидролизат сердца овец	10,0-20,0
Гидролизат гороха и сои	10,0-15,0	Панкреатический гидролизат печени овец	10,0-20,0
Перевар Хоттингера	10,0-15,0	Перевар Хоттингера	10,0-20,0
Печеночный экстракт	10,0-20,0	Печеночный экстракт	10,0-20,0
Панкреатический гидролизат казеина	1,0-2,0	Панкреатический гидролизат казеина	1,0-2,0
Пептон	0,2-0,5	Пептон	1,0-2,0
Сухой дрожжевой экстракт	0,4-0,6	Тиамин	0,0002-0,0003
Натрий хлористый	0,2	L- цистеин	000005-0,0001
L-аргинин	0,02	L-аргинин	000005-0,0001
Кальций хлористый	0,004-0,006	Кальций хлористый	0,001-0,002
Магний серноокислый	0,003-0,005	Магний серноокислый	0,001-0,002

Железо сернокислое	0,00005-0,00015	Железо сернокислое	0,0005-0,001
Твин 80	0,05	Кобальт хлористый	0,001-0,015
Цинк сернокислый	0,0005-0,0015	Цинк сернокислый	0,0005-0,001
Медь сернокислая	0,0005-0,0015	Медь сернокислая	0,0005-0,001
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	1,8	Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,008-0,01
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,3	Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,006-0,008
Глюкоза	0,2	Глюкоза	5,0-10,0
Припинол Б-400	0,1		
Вода дистиллированная (рН 7,2 ± 0,2)	остальное	Вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2)	остальное

Таблица 2.

## Иммуногенные свойства предлагаемой вакцины в сравнении с коммерческой

Вид животных	Вакцина	Заразили	Всего	Заболело, пало	Здоровы
Кролики	Заявленная	Cl. perfringens - В	3	0	3
		Cl. perfringens - С	3	0	3
		Cl. perfringens - Д	3	0	3
		Cl. oedematiens	5	0	5
Кролики	Коммерческая	Cl. perfringens - В	3	1	2
		Cl. perfringens - С	3	0	3
		Cl. perfringens - Д	3	0	3
		Cl. oedematiens	5	1	4
Кролики	Контрольная	Cl. perfringens - В	3	3	0
		Cl. perfringens - С	3	3	0
		Cl. perfringens - Д	3	3	0
		Cl. oedematiens	5	5	0
Белые мыши	Заявленная	Cl. septicum	10	0	10
Белые мыши	Коммерческая	Cl. septicum	10	1	9
Белые мыши	Контрольная	Cl. septicum	10	10	0

**ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ**

Способ получения поливалентной вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, включающий культивирование штаммов *Clostridium septicum*, *Clostridium oedematiens* и *Clostridium perfringens* типов В, С и Д на жидкой питательной среде, при этом питательная среда содержит перевар Хоттингера, печеночный экстракт, панкреатический гидролизат казеина, пептон, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, глюкозу, L-аргинин, кальций хлористый, магний сернокислый, цинк сернокислый, медь сернокислую, железо сернокислое и воду, обработку формалином, концентрирование, смешивание анакультур и расфасовку, *отличающийся* тем, что в питательную среду дополнительно добавляют панкреатический гидролизат сердца овец, панкреатический гидролизат печени овец, тиамин, L- цистеин, кобальт хлористый и воду деминерализованную (рН 7,2 ± 0,2) при следующих соотношениях компонентов мас. %:

панкреатический гидролизат сердца овец 10,0-20,0  
панкреатический гидролизат печени овец 10,0-20,0  
перевар Хоттингера 10,0-20,0  
печеночный экстракт 10,0-20,0  
панкреатический гидролизат казеина 1,0-2,0  
пептон 1,0-2,0  
тиамин 0,0002-0,0003  
L- цистеин 0,00005-0,0001  
L-аргинин 0,00005-0,0001  
кальций хлористый 0,001-0,002  
магний сернокислый 0,001-0,002  
железо сернокислое 0,0005-0,001  
кобальт хлористый 0,001-0,015  
цинк сернокислый 0,0005-0,001  
медь сернокислая 0,0005-0,001  
натрий фосфорнокислый двузамещенный 0,008-0,01  
калий фосфорнокислый однозамещенный 0,006-0,008  
глюкоза 5,0-10,0  
вода деминерализованная (рН 7,2 ± 0,2) остальное.

7834

Верстка Д. Женысова  
Корректор Г. Косанова