

(11) Patento numeris: **3985**

(51) Int. Cl.⁵: **A61K 39/00**
C12N 5/04

(21) Paraiškos numeris: **IP1918**

(22) Paraiškos padavimo data: **1994 04 20**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 11 27**

(45) Patento paskelbimo data: **1996 06 25**

(72) Išradėjas:

Ljubov Markovna Yablochnik, RU
Karen Artemovich Sarkisov, RU
Konstantin Pavlovich Letyagin, RU
Alexandr Nikolaevich Panin, RU

(73) Patento savininkas:

VSEROSSIISKY GOSUDARSTVENNY NAUCHNO-ISSL. INSTITUT
KONTROLYA, STANDARTIZATSII, SERTIFIKATSII VETERINARNYKH
PREPARATOV, Zvenigorodskoe shosse, 5, Moscow, RU

(74) Patentinis patikėtinis:

Rita Laurinavičiūtė, 5, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(83) Mikroorganizmo deponavimas:

27-DEP, VSEROSSIISKY GOSUDARSTVENNY NAUCHNO-ISSL. INSTITUT
KONTROLYA, STANDARTIZATSII, SERTIFIKATSII VETERINARNYKH
PREPARATOV, RU

(54) Pavadinimas:

Vakcina prieš gyvulių trichofitiją

(57) Referatas:

Išradimas susietas su veterinarija, o būtent su gyvulių trichofitijos profilaktika ir gydymu. Siūloma vakcina prieš gyvulių trichofitiją skiriasi nuo žinomų vakcinų tuo, kad papildomai turi grybo *Trychophyton mentagrophytes* kamieno VGNKI Nr. 27 antigeno kiekį, kurio užtenka, kad būtų iššaukta gyvulio imuninė reakcija.

Išradimas yra susietas su biotechnologija, konkrečiai su vakcinomis prieš gyvulių trichofitiją.

Žinoma vakcina LTF-130 ir vakcina TF-130/K prieš gyvulių, pagrindinai stambųjų raguočių, trichofitiją, turinti antigeną iš kamieno *Trichophyton faviforme* Nr. 130 (Sin. *Tr. verrucosum*) arba antigeną iš kamieno *Tr. faviforme* 130L ir želatinos-sacharozės stabilizatorių (žr. GB patentą Nr. 1330240, buv. SU autorinį liudijimą Nr. 955571).

Žinomų vakcinų trūkumas yra tas, kad jomis profilaktiškai galima užkirsti kelią tik vienos rūšies gyvulių - stambųjų raguočių susirgimui ir tik nuo vienos rūšies sukėlėjo *Tr. faviforme*.

Pagal Bodiną (1902) (žr. V.M. Leščenko, "Laboratornaja diagnostika gribkovych zabolevanij", M., "Medicina", 1982, psl. 109) patiksliname kamieną *Tr. flaviforme* 130L į *Tr. verrucosum*, kadangi pagal Georgą (1957) (žr. ten pat, psl. 34) gyvulių trichofitijos sukėlėjo pagrindinis pavadinimas yra *Tr. verrucosum*.

Išradimo tikslas yra sukūrimas didelio imunogeniškumo vakcinos prieš gyvulių trichofitiją, vadinamą *Tr. verrucosum*, *Tr. verrucosum var autotrophicum*, *Tr. mentagrophytes*, *Tr. equimen*, *Tr. sarkisovii*.

Nurodytas tikslas pasiekiamas tuo būdu, kad vakcina papildomai turi antigeną iš kamieno *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27, esant žemiau nurodytiems komponentų santykiams (svorio/tūrio %):

Antigenas iš kamieno <i>Tr. verrucosum</i> 130L	300-600 mln mikrokonidijų/cm ³
Antigenas iš kamieno <i>Tr. Mentagrophytes</i> VGNKI Nr.27	300-600 mln. mikrokonidijų/cm ³
Sacharozė	10,0 - 20,0
Želatina	1,5 - 4,0
Vanduo	likęs kiekis

Vakcinos gamybai naudoja kamieną *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27.

Kamienas *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 yra gautas iš epizootinio, išskirto iš baltosios pelės, naudojant kryptingos laipsninės atrankos metodą pagal greičiausiai augančių kolonijų su aktyviu mikrokonidijų susikaupimu požymį.

Kamienas *Tr. mentagrophytes* Nr.27 yra deponuotas Rusijos valstybinio mokslotiriamojo veterinarinių preparatų kontrolės, standartizacijos ir specifikacijos instituto mikroorganizmų kolekcijoje ir jo registracijos numeris yra 27.

Grybo *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 kamieną apibūdina šie požymiai ir savybės:

Morfologiniai požymiai. Micelė nespalsvota, lygi, šakota, septiruota, gali suskilti į fragmentus, terminaliniai gifai nevisada sudaro spirales (paprastai 3 - 5 vingiai), micelės diametras 2,0-3,0 μm . Mikrokonidijų daug, jos apvalios, kriaušės formos, pailgėjusios, artimos lazdelių formai, micelės paviršiuje būna kekėmis, dažniau atskirai, dydis 1,5 - 5,2 μm . Mikrokonidijos vienetinės. Pertvarėlių kiekis 1 - 5, dažniau 1 - 2, dydis 13-30 x 3-8 μm .

20 - 30 dienų amžiaus kultūrose gali būti stebimos apvalainės formos su dviejų kontūrų apvalkalu chlamidosporos, visada atskiros, diametras 3,0 - 5,0 μm . Artosporos atsiranda ant atskirų micelės dalių, jos plonasienės, jų forma primena 3,0 - 9,0 μm ovalines arba lazdelės formos mikrokondinijas.

Kultūrų savybės. Misos agare auga kaip plokščia, balta, aksominė kolonija su nedideliu iškilimu viduryje, augantis kraštas lygus, apatinė pusė raudonai ruda, kolonijos diametras 50 - 90 mm (15 - 20 dienų kultūra).

Saburo agare auga kaip plokščia, balta, aksominė su kreminiu atspalviu kolonija su nedideliu iškilimu centre, augantis kraštas lygus, apatinė pusė blyškiai geltona, kartais tamsesnė centre, kolonijos dydis 50 - 90 mm (15 - 20 dienų kultūra).

Hennebergo terpėje auga kaip balta, aksominė, radialinė-klostuota kolonija, augantis kraštas voratinklio formos, apatinė pusė raudonai violetinė, kolonijos diametras 50 - 80 mm (15 - 20 dienų kultūra).

Sporų susidarymas. Maksimalus sporų susidarymo kiekis misos agare 198,4 - 259,2 mln/cm³.

Virulentinės savybės. Suleidus į raumenis kamieno *Tr. mentagrophytes* Nr.27 kultūrą, jūros kiaulytėms, triušiams, avims, ožkoms, veršeliams po 2 - 3 savaitių injekcijos vietoje išsivysto specifinis lokalizuotas paviršinis 2,0 - 2,5 cm židinėlis, kuris per 15 - 20 dienų savaime užgyja. Mikologiskai išskirti sukėlėją nepavyksta. Uždėjus kamieno kultūrą neimunizuotiems gyvuliams ant skarifikuotos odos (dozė - 0,25 mln/cm³ mikrokonidijų) per 10 - 20 dienų aplikacijos vietoje išsivysto tipiškas grichofitinis židiny. Iš patologinės medžiagos išskirto kamieno savybės atitinka pradinio kamieno savybes.

Antigeninės savybės. Suleidus kamieno kultūras, prieš jas veršelių, avių, triušių organizme susidaro specifiniai agliutininai, kurių titrai 1:40 - 1:1280.

Imunogeninės savybės. Du kartus suleidus į raumenis veršeliams, triušiams vakcinos, pagamintos iš šio kamieno, dozę, turinčią 10 - 20 mln. gyvų mikrokonidijų, gyvuliams susidaro imunitetas užsikrėtimui trichofitija, imuniteto trukmė ne mažiau 5 metų (stebėjimo laikas).

Kamienas *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 skiriasi nuo epizootinių silpnų virulentiškumu, neužsikrėtimu, esant kontaktui tarp gyvulių, dideliu mikrokonidijų susikaupimo aktyvumu ir imunogeniškumu, suleidus į raumenis gyvuliams.

Išradimą atitinkančios vakcinos gavimo pavyzdžiai

1 pavyzdys

Vakcinai gauti 15 - 20 dienų kamienų *Tr. verrucosum* 130L ir *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 kultūras atskirai augina 12 - 20 dienų matracinėse kolbose misos agare (pH 6,2 - 6,8) 26 - 28 °C temperatūroje.

Išaugintą kiekvienos kultūros grybieną aseptiškais sąlygomis specialiais gremžtukais nuima nuo maitinančiosios terpės paviršiaus ir patalpina į sterilius stiklainius. Kiekvieno kamieno grybienos masę homogenizuoja mikseriuose arba koloidiniame malūne, o po to, naudojant sterilų vandenį, gautą *Tr. verrucosum* 130 L homogenatą resuspenduoja iki mikrokonidijų koncentracijos 300 mln./cm³, o homogenatą *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 - iki 600 mln./cm³. Resuspendavimą atlieka esant penicilinui arba streptomycinui, skaičiuojant 100 vnt. 1 cm³ homogenato. Sumaišomi lygūs tūriai grybo *Tr. verrucosum* 130L kamieno ir grybo *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 kamieno homogenatų. Į gautą grybienos masės suspensiją prideda lygų kiekį stabilizatoriaus (pH 6,2 - 6,8), turinčio 10 % sacharozės ir 1,5 % želatinos vandenyje. Viską kruopščiai sumaišo, išpilsto į sterilius flakonus ir liofiliškai išdžiovina.

2 pavyzdys

Vakciną gauna taip pat, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Jos paruošimui naudoja grybų *Tr. verrucosum* 130L ir *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27 kamienų homogenatus, kuriuose

mikrokonidijų koncentracija yra 450 mln./cm³, o stabilizatoriumi naudojamas vandeninis tirpalas, kuriame yra 15% sacharozės ir 2,5% želatinos.

3 pavyzdys

Vakciną prieš gyvulių trichofitiją ruošia taip pat, kaip aprašyta 1 pavyzdyje. Jai gauti naudoja grybo *Tr. verrucosum* 130L kamieno homogenatą, kuriame mikrokonidijų koncentracija yra 600 mln./cm³, ir kamieno *Tr. mentagrophytes* Nr.27 homogenatą, kuriame mikrokonidijų koncentracija yra 300 mln./cm³. Stabilizatoriumi naudojamas vandeninis tirpalas, turintis 20% sacharozės ir 4% želatinos.

Paruošta vakcina yra vienalytė korėta sausa masė, pilkos spalvos tabletės formoje. Vakcina išlaiko savo biologines savybes, jei laikoma uždaroje, tamsioje patalpoje 2 - 10 °C temperatūroje. Galiojimo laikas - 12 mėnesių. Prie vakcinos pridedami flakonai su steriliu skiedikliu.

4 pavyzdys

Serijas vakcinų prieš gyvulių trichofitiją, paruoštų pagal 1, 2, 3 pavyzdžius, prieš naudojimą ištirpina skiediklyje, skaičiuojant 1 dozė 1 cm³. Gauna vakcinų serijas, turinčias skiepyjamoje dozėje šias antigenų koncentracijas mln./cm³ (1 lentelė).

1 lentelė

Antigeno pavadinimas	Vakcina pagal 1 pavyzdį	Vakcina pagal 2 pavyzdį	Vakcina pagal 3 pavyzdį
<i>Tr. verrucosum</i> 130L	5	7,5	10
<i>Tr. mentagrophytes</i> VGNKI Nr.27	10	7,5	5

Vakciną pagal 1, 2, 3 pavyzdį naudoja veršelių imunizavimui, suleidami 1 cm³ dozę į raumenis du kartus 10 - 14 dienų intervale.

Kaip kontrolinį pavyzdį naudoja analogiškai pagamintas vakcinas iš kamieno *Tr. verrucosum* 130L ir *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27, kuriose skiepyjimo dozėje antigeno mikrokonidijų koncentracija yra 7,5 mln./cm³. Praėjus 35 dienoms po antrosios imunizacijos, veršelius užkrečia kamienų *Tr. verrucosum* Nr.153 (TB-153), *Tr. mentagrophytes* Nr.251 (TC-251), *Tr. sarkisovii* 724 (TC-724), *Tr. verrucosum* var.

antothropiem 118 (TB-118). Tuo pat metu tomis pačiomis kultūromis užkrečia 6 kontrolinius (neimunizuotus) veršelius.

Eksperimentinio veršelių užkrėtimo rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Grupės Nr.	Gyvulių skaičius grupėje	Biopreparatas, naudojamas ver- šelių imunizacijai	Imuni- zuota veršelių	Susirgusių gyvulių skaičius, užkrėtus eksperimentiškai				
				TB-153	TM-251	TC-724	TB-118	TB-20
1	9	Vakcina pagal 1 pavyzdį	9	0	0	0	0	0
2	10	Vakcina pagal 2 pavyzdį	10	0	0	0	0	0
3	7	Vakcina pagal 3 pavyzdį	7	0	0	0	0	0
4	10	Vakcina iš kamieno <i>Tr. vernucosum</i> 130L	10	0	4	2	0	1
5	9	Vakcina iš kamieno <i>Tr. mentagrophytes</i> VGNKI Nr.27	9	5	0	1	2	2
6	6	Kontrolė (neimunizuoti)	-	2	2	2	2	2

Iš lentelės matyti, kad 1, 2 ir 3 serijos vakcinos imunizuotiems veršeliams išvysto aukšto laipsnio (100%) imunitetą prieš trichofitiją eksperimentinio užkrėtimo atveju. Veršelių imunizacija monovakcinomis neišvysto pakankamai atsparaus imuniteto, jei po to užkrečiama heterologinėmis trichofitijos sukėlėjų kultūromis. Anksčiau neimunizuoti ir nesirgę trichofitija veršeliai linkę eksperimentiniam užsikrėtimui virulentinėmis trichofitijos sukėlėjų kultūroms.

5 pavyzdys

Analogiškai 4 pavyzdžiui, trimis bandomosiomis vakcinos serijomis imunizuoja 14 ožkų, o po to jas užkrečia kamienų *Tr. vernucosum* Nr.153 ir *Tr. mentagrophytes* Nr.251 virulentinėmis kultūromis. Kontroliniai gyvuliai (2 gyvuliai) neimunizuojami.

Visi vakcinuoti gyvuliai nesusergo trichofitija, pas kontrolinius gyvulius buvo pastebėti visi susirgimo požymiai, iš pažeidimo židinių išskirti virulentinių kultūrų nurodyti kamieniai.

6 pavyzdys

10 šinšių veislės triušių, kurių gyvas svoris 2,5 - 3,0 kg, imunizavimui naudoja 2 pavyzdžio vakciną. Prieš naudojimą vakciną ištirpina skiediklyje, skaičiuojant 1 dozė 1 cm³.

Gauna šią antigenų koncentraciją 1 skiepyjimo dozėje: 7,5 mln mikronidijų *Tr. vernicosum* 130L ir 7,5 mln. mikrokonidijų *Tr. mentagrophytes* VGNKI Nr.27.

Vakciną du kartus suleidžia triušiams į raumenis, vienkartinė dozė - 0,5 cm³. Kontrolei 10 triušių vakcinacijai naudoja vakciną iš kamieno *Tr. mentagrophytes* Nr.135, kurioje 1 skiepyjimo dozėje yra 20 mln. mikrokonidijų 1 cm³, šią vakciną suleidžia į raumenis sėdmenų raumenų srityje. Po 30 dienų triušius odos paviršiuje užkrečia kamienų *Tr. mentagrophytes* Nr.251 ir *Tr. mentagrophytes* Nr.18 virulentinėmis kultūromis. Per 25 dienas registruojami užkrėtimo rezultatai. Nustatyta, kad vakcinos panaudojimas padeda užtikrinto imuniteto susidarymui pas visus imunizuotus triušius, tuo pat metu žinomos vakcinos Mentavak panaudojimas neduoda patikimo efekto - 2 iš 10 triušių susirgo trichofitija, o iš pakenkimo židinių išskirtos virulentinių kamienų kultūros.

7 pavyzdys

20 veršelių imunizuoja 1 ir 3 pavyzdžio vakcinų variantais, kuriuose skiepyjimo dozėje antigenų koncentracija atitinka 4 pavyzdį. Kiekvienoje veršelių grupėje (10 gyvulių) vakcina du kartus leidžiama į raumenis po 1 cm³ su 10 - 14 dienų intervalu. Praėjus 4 ir 9 mėnesiams po antrosios imunizacijos abi veršelių grupės užkrečia kamienų *Tr. vernicosum* Nr.153 ir *Tr. mentagrophytes* Nr.251 virulentinėmis kultūromis. Nei vienas veršelis nesusirgo. Taigi, išradimą atitinkanti vakcina išlaiko patvarų imunitetą praėjus 4 ir 9 mėnesiams po užkrėtimo.

Vakcina pasižymi dideliu efektyvumu prieš gyvulių trichofitiją. Profilaktiniam tikslui vakciną naudoja du kartus su 10 - 14 dienų intervalu šiomis dozėmis:

veršeliams nuo 14 dienų iki 4 mėnesių - 1 cm³, vyresniems nei 5 mėnesiai - 2 cm³, ir suaugusiems raguočiams (avys, ožkos) nuo 3 iki 6 mėnesių - 0,5 cm³, vyresniems nei 6 mėnesiai - 1 cm³. 2,5 - 3,0 kg masės triušiams profilaktiniu tikslu suleidžia 0,3 - 0,5 cm³. Gydomo tikslu sergantiems gyvuliams vakciną leidžia du kartus su 10 - 14 dienų intervalu, naudojant dvigubą dozę.

Išradimą atitinkančios vakcinos panaudojimas veterinarinėje praktikoje leis padidinti priemonių kovai su gyvulių trichofitija efektyvumą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

Vakcina prieš gyvulių trichofitiją, turinti antigeną iš kamieno *Trychophyton verrucosum* 130L, sacharozę, želatiną ir vandenį, besiskirianti tuo, kad joje papildomai yra antigenas iš kamieno *Trychophyton mentagrophytes* VGNKI Nr.27, kurioje komponentų santykiai (svorio/tūrio %) yra tokie:

antigenas iš kamieno <i>Trychophyton verrucosum</i> 130L	300-600 mln. mikrokonidijų/cm ³
antigenas iš kamieno <i>Trychophyton mentagrophytes</i> VGNKI Nr.27	300-600 mln. mikrokonidijų/cm ³
sacharozė	10,0 - 20,0
želatina	1,5 - 4,0
vanduo	likęs kiekis.