



(19) KG (11) 1226 (13) C1 (46) 28.02.2010

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) A61K 35/23 (2009.01)
C12N 7/08 (2009.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20080019.1

(22) 14.02.2008

(46) 28.02.2010, Бюл. №2

(76) Джапаралиев Н.Т., Джапаралиев Т.О. (KG)

(56) Кутумбетов Л.Б., Зиновьева М.С., Корчагина Н.И., Назаров А.С. Цитопатогенная активность клона Г-35 вируса оспы коз в культуре клеток гонады козы. // Актуальные проблемы патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота: материалы конференции молодых ученых. – Владимир, 2002. – С. 7-11

(54) Сухая вирусвакцина против оспы коз из штамма "ГК"

(57) Изобретение относится к области ветеринарии, в частности, к приготовлению вирусвакцины против оспы коз. Задачей изобретения является разработка средства для профилактики оспы коз из местного специфического и экологически безопасного антигена. Поставленная задача решается тем, что в сухой вирусвакцине против оспы коз, включающей вирусодержащий материал из аттенуированного штамма оспы коз, стабилизатор, питательную среду, в качестве вирусодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм «ГК», репродуцированный на первичной трипсинизированной культуре клеток почки козы с титром $10^{-7.0}$ тератогенного цитопатического действия (ТДЦ) 50/мл.

(21) 20080019.1

(22) 14.02.2008

(46) 28.02.2010, Bull. №2

(76) Dzhaparaliev N.T., Dzhaparaliev T.O. (KG)

(56) Kutumbetov L.B., Zinoveva M.S., Korchagina N.I., Nazarov A.S. Cytopathogenic activity of the G-35 clone of goats' smallpox virus in biocytocultures of goat's genital gland.//Actual problems of pathology of pigs, bovine animals and small cattle: materials of young scientists' conference. - Vladimir, 2002. - pages 7-11

(54) Dry vaccine against the goats' smallpox from "GC" strain

(57) Invention relates to veterinary science area, in particular, to preparation of virus vaccine against the smallpox of goats. The invention problem is working out of preparation for prophylaxis of smallpox of goats from the local specific and environmentally safe antigen. The task in view is decided by that in dry vaccine against the goats' smallpox, including virus containing material from attenuated strain of goats' smallpox, the stabilizer, the nutrient medium, as a viruliferous material, the local adapted specific «GC»strain is additionally used, which is reproduced on the base of initially-trypsinized culture of kidney cages of a kid with $10^{-7.0}$ of teratogenic cytopathic effect (TCE) 50/ml titre.

(19) KG (11) 1226 (13) C1 (46) 30.01.2010

Изобретение относится к области ветеринарии, в частности, к приготовлению вирусвакцины против оспы коз.

Известна вирусвакцина из штамма «Г-35», применяемая против оспы коз в России, странах Ближнего Востока, Центральной Азии (Кутумбетов Л.Б., Зиновьева М.С., Корчагина Н.И., Назаров А.С. Цитопатогенная активность клона Г-35 вируса оспы коз в культуре клеток головы козы. // Актуальные проблемы патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота: материалы конференции молодых ученых. – Владимир, 2002. – С. 7-11).

Недостатком вакцины из штамма «Г-35» является то, что данная вакцина неустойчива, экологически небезопасна, так как обладает реверсией, имеет низкую иммуногенность.

Указанные недостатки вакцины из штамма «Г-35» ограничивают ее применение в ветеринарной практике против оспы коз.

Задачей изобретения является разработка средства для профилактики оспы коз из местного специфического и экологически безопасного антигена.

Поставленная задача решается тем, что в сухой вирусвакцине против оспы коз, включающей вирусодержащий материал из аттенуированного штамма оспы коз, стабилизатор, питательную среду, в качестве вирусодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм «ГК», репродуцированный на первичной трипсинизированной культуре клеток почки козы с титром $10^{-7.0}$ ТДД₅₀/мл.

Поддержание штамма «ГК».

Вакциненный штамм «ГК» сохраняют при температуре минус $(40\pm1)^\circ\text{C}$ в лиофилизированном виде. Штамм периодически (через каждые 3 года) «освежают» в культуре клеток почки козы с последующей лиофилизацией. Титр вируса вакцинного штамма за указанный срок хранения может снизиться в пределах 1.0 lg ТДД₅₀/мл. При этом допускается не более 10-кратное его пассивирование.

Очередную серию вакцинного штамма готовят из лиофилизированного вируса в количестве 150-200 ампул. Для «освежения» вируса отбирают необходимое количество матрасов с выросшей монослойной культурой почки козы 5-10 суточного возраста. В культуре не должно быть каких-либо признаков спонтанной дегенерации клеток (зернистость, вакуолизация клеток, очаги разрушения клеток, отслоения клеток от стекла, изменения характерной формы клеток).

Берут 2-4 ампулы, содержащие по 2 мл лиофилизированного вируса, содержимое их разводят в 10-кратном объеме поддерживающей среды. Среду выращивания из матрасов с культурой клеток сливают и в них вносят разведенный вирус в объеме по 20 мл в 1.5 литровые матрасы. Инфицированные культуры выдерживают в термостате при $(37\pm0.5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч с периодическим орошением поверхности матраса монослоя клеток внесенным вирусом. После этого в сосуды вводят поддерживающую среду по 200 мл в 1.5-литровые матрасы.

Для контроля оставляют незараженными 2-3 матраса, в которые вносят только поддерживающую среду и инкубируют как инфицированные в стационарном положении при $(37\pm0.5)^\circ\text{C}$. Смену среды в матрасах проводят через каждые трое суток. Развитие вируса в культуре клеток определяют по характерному цитопатическому действию. Микроскопию матрасов проводят ежедневно.

При развитии выраженных цитопатических изменений (70-90 % клеточного монослоя), обычно на 5-10 сутки, матрасы замораживают при температуре минус $(40\pm1)^\circ\text{C}$. В контрольных матрасах не должно быть каких-либо деструктивных изменений клеток. На следующие сутки замороженные культуры оттаивают при комнатной температуре, из каждого матраса берут пробы в количестве по 5 мл для проверки на отсутствие бактериального загрязнения и определения активности вируса. Вирусную суспензию до получения результатов контроля на стерильность и определения активности хранят при температуре $(4\pm1)^\circ\text{C}$ не более 15 сут. При активности вируса не ниже $10^{-5.5}$ ТДД₅₀/мл стерильный вирусодержащий материал используют для приготовления серии вакцинного вируса. С этой целью содержимое стерильных матрасов сливают в один сосуд, добавляют стабилизирующий раствор, охлажденный до $(4\pm1)^\circ\text{C}$, в соотношении 1:1 пенициллин 500000 ЕД, стрептомицин 500 мг на 1 литр смеси.

Приготовленную смесь разливают в стерильные ампулы по 2 мл и ставят в металлические кассеты, которые устанавливают на предварительно охлажденные до температуры минус 10-20°C полки штатива.

Штатив помещают в низкотемпературную камеру и проводят замораживание содержимого ампул до температуры минус 57-58°C в течение 8-12 час. Затем штатив с ампулами переносят в охлажденную камеру вакуумной сублимационной установки. После высушивания ампулы запа-

ивают при остаточном давлении от 15 ПА до 30 ПА.

Препарат в ампулах, до заключения о его качестве, сохраняют при температуре (4±1)°С. При получении положительных результатов ампулы этикетируют, упаковывают и закладывают на хранение при температуре (4±1)°С.

Контроль вакцинного штамма.

Вакцинныи штамм «ГК» подвергают техническому и биологическому контролю. Через каждые 5 пассажей штамм проверяют на специфичность в реакции нейтрализации, на способность вируса размножаться в культуре клеток почки козленка с характерными цитопатическими изменениями и накапливаться в ней в титрах $10^{-5.5} - 10^{-6.5}$ ТДД₅₀/мл.

Для проверки специфичности вакцинного штамма используют иммунную сыворотку, полученную от коз на 21 сутки после введения вируса штамма «ГК». Сыворотка должна быть стерильной, вируснейтрализующая активность ее должна составлять не ниже 2.0 Ig ТДД₅₀/мл. Специфичность цитопатического действия вируса проверяют одновременно с его титрованием.

Пример. Процесс получения вируссодержащей суспензии производственного вируса оспы коз из штамма «ГК» включает следующие операции:

- отбор сосудов с выросшей монослоиной культурой клеток почки козы;
- инфицирование сосудов вирусом;
- инкубирование зараженных сосудов;
- микроскопия;
- отбор сосудов для замораживания, взятие проб для контроля на стерильность и замораживание при минус (40±1)°С;
- оттаивание;
- слияние вируссодержащего материала в одну емкость;
- определение биологической активности вируса.

Для получения вирусвакцины используют выращенную в матрасах культуру клеток почки козы с хорошим монослоем 5-10 суточного возраста.

Для изготовления 800000 доз вирусвакцины необходимо получить 8.0 л. суспензии. Для этого берут 48 матрасов емкостью 1.5 л и с культурой клеток, в них вносят (200±20) мл, вирусной суспензии разведенной поддерживающей средой (доза заражения 0.05-0.06 ТДД на клетку). Зараженные матрасы культивируют в стационарном положении при температуре (37±0.5)°С. Срок культивирования вируса в круговых сосудах 3-4 суток без смены среды. Для контроля незараженными оставляют по 3 сосуда, которых поддерживают в одинаковых условиях с инфицированными. Начиная с 2 суток инкубирования, инфицированные сосуды ежедневно микроскопируют.

Сосуды, в которых наблюдается цитопатические изменения на 70-90 % клеточного монослоя (обычно на 3-4 сут.), отбирают из каждого сосуда делают высеи на стерильность, замораживают при минус (40±1)°С, сохраняют при этой температуре до получения результатов контроля стерильности.

Содержимое сосудов без бактериального загрязнения оттаивают, сливают в одну емкость, тщательно перемешивают, из общей массы берут 3 пробы для определения биологической активности. Титр вируссодержащей суспензии должен быть не ниже $10^{-5.5}$ ТДД₅₀/мл. Вируссодержащую суспензию до получения результатов по определению биологической активности хранят при температуре 4°C не более 15 суток.

Примерный расчет потребности основных компонентов для приготовления 800000 доз вакцины:

– животные: 4 козленка – 2 месячного возраста для получения первично-трипсинизированной культуры клеток (почки ягненка), раствор Хенкса – 8 л; 0.25 %-ный раствор трипсина – 8 л; среда ПСП – 70 л; сыворотка крупного рогатого скота – 3.2 л; 8.0 % раствор соды (двууглекислого натрия) – 1.8 л; пенициллин – 245 млн; нистатин 3650000 ЕД; стрептомицин – 245 г; матриксная расплодка вируса – 900 мл; пептон – 2 кг; сахароза – 1.2 кг. На брак допускается 20 % материалов.

К вируссодержащей культуральной жидкости добавляют защитную среду, охлажденную до (4±1)°С, в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД и стрептомицин 0.5 г на 1 л. смеси. Содержимое сосуда тщательно перемешивают. Смесь разливают при помощи специальных дозирующих аппаратов или шприцами-автоматами по 2 мл в стерильные ампулы или флаконы по 2 мл.

Заполненные вирусвакциной ампулы или флаконы помещают в металлические кассеты, покрывают стерильной тканевой салфеткой и переносят в цех сушки.

Технология получения сухой вирусвакцины сублимационным методом состоит из предва-

рительного замораживания смеси вируссодержащей суспензии с защитной средой, разлитой в ампулы или флаконы, и последующего удаления влаги из замороженного состояния в вакууме на установке типа SMV.

Ампулы с высушенной вакциной запаивают на карусельно-коллекторном аппарате при остаточном давлении от 15 Па до 30 Па. Флаконы с вакциной перекрывают стерильными резиновыми пробками под вакуумом в камере сублимационной установки при выпуске воздуха или в вакуумной установке и обкатывают металлическими колпачками. Запаянные ампулы и закрытые флаконы проверяют визуально на отсутствие трещин.

После заключения о возможности выпуска препарата к практическому применению ампулы или флаконы с вакциной этикетируют и упаковывают.

Формула изобретения

Сухая вирусвакцина против оспы коз, включающая вируссодержащий материал из аттенуированного штамма оспы коз, стабилизатор, питательную среду, отличающаяся тем, что в качестве вируссодержащего материала используют местный адаптированный специфический штамм "ГК", репродуцированный на первичной трипсинизированной культуре клеток почки козы с титром $10^{-7.0}$ ТДЦ₅₀/мл.

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба ИС КР, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03