

(19) **KG** (11) **1357** (13) **C1** (46) **31.05.2011**ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ(51) *A61K 35/23* (2011.01)
C12N 7/08 (2011.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ****к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя**

(21) 20090147.1

(22) 22.12.2009

(46) 31.05.2011, Бюл. №5

(71)(73) Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии имени А. Дуйшеева (KG)

(72) Джапаралиев Н.Т., Нургазиев Р.З., Мамытова А.Т., Орозов Ж.Ч., Мусуралиев К.К. (KG)

(56) Патент RU №2121366, C1, кл. A61K 39/275, C12N 7/00, C12N 5/00, C12N 5/02, 1998

(54) **Сухая аттенуированная вакцина против оспы овец из штамма "Күл"**

(57) Изобретение относится к области ветеринарии, микробиологии и медицины, в частности, к приготовлению вакцины против оспы овец, его можно использовать для разработки специфических препаратов против инфекционных болезней. Задачей изобретения является разработка средства профилактики оспы овец из местного специфического и экологически безопасного антигена, которая будет обеспечивать желаемый уровень защиты поголовья в странах Центральной Азии. Преимуществом применения сухой аттенуированной вакцины против оспы овец является высокая иммуногенность и экологическая безопасность. Она позволяет обеспечить высокий поствакцинальный иммунитет против указанной инфекции до 98 %. Такой эффект вакцины достигается за счет поступления в организм животного местного специфического штамма «Күл». В этом случае иммунокомпетентные органы интенсивнее стимулируют синтез антител. Сухая аттенуированная вакцина против оспы овец содержит в своем составе местный адаптированный специфический штамм «Күл» и стабилизатор триголаза. 1 н. п. ф.

(21) 20090147.1

(22) 22.12.2009

(46) 31.05.2011, Bull. №5

(71)(73) Kyrgyz Research Institute of Veterinary Medicine, named after A. Duysheev (KG)

(72) Dzhaparaliev N.T., Nurgaziev R.Z., Mamytova A.T., Orozov Zh.Ch., Musuraliev K.K. (KG)

(56) Patent RU №2121366, C1, cl. A61K 39/275, C12N 7/00, C12N 5/00, C12N 5/02, 1998

(54) **Dry attenuated smallpox vaccine against sheep-pox from strain "Kul"**

(57) The invention relates to the field of veterinary science, microbiology and medicine, in particular, to preparation of vaccine against sheep-pox, it can be used to create new specific preparations against infectious diseases. Problem of the invention is development of means for sheep pox prophylaxis from the local specific and environmentally safe antigen, which will provide the desired protection level of the livestock population in Central Asia. The advantage of application of dry attenuated vaccine against sheep-pox is high immunogenic and environmental safety. It ensures high postvaccinal immunity against specified infection, up to 98%. Such effect of the vaccine application is attained through the introduction of the local specific strain "Kul" into the animal organism. In this case immunocompetent body organs

(19) **KG** (11) **1357** (13) **C1** (46) **31.05.2011**

stimulate the antibodies synthesis more intensively. Dry attenuated vaccine against sheep pox contains local adapted specific strain "Kul" in its structure and trigolaz stabilizer. 1 indep. claim.

Изобретение относится к области ветеринарии, микробиологии и медицины, в частности, к приготовлению вакцины против оспы овец.

Наиболее близким к предполагаемому изобретению является вакцина ФГУ «ВНИИЗЖ», содержащий аттенуированный штамм с титром биологической активности $\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и стабилизатора (Патент RU №2121366, С1, кл. А61К 39/275, С12N 7/00, С12N 5/00, С12N 5/02, 1998). Недостатком данного штамма является низкая биологическая, антигенная и иммуногенная активность.

Недостатком вакцины из штамма ФГУ «ВНИИЗЖ» является то, что данная вакцина обладает недостаточной иммуногенной активностью в условиях Кыргызской Республики, так как данная вакцина разрабатывалась с учетом климатических условий Российской Федерации. По этой причине она имеет низкую иммуногенность и не дает желаемый уровень защиты поголовья. Указанные недостатки вакцины из штамма ФГУ «ВНИИЗЖ» ограничивают ее применение в ветеринарной практике против оспы овец в нашей стране и странах Центральной Азии.

Задачей изобретения является разработка средства профилактики оспы овец из местного специфического и экологически безопасного антигена, которая будет обеспечивать желаемый уровень защиты поголовья в нашей стране и странах Центральной Азии.

Поставленная задача решается добавлением в вакцину субкультуры клеток почек ягненка, среды Игла, раствора Хэнкса, защитной среды, антибактериальных и противогрибковых препаратов, которая содержит в своем составе местный адаптированный специфический штамм «Кул» и стабилизатор триголаза.

Для приготовления вакцины ведется работа с вакцинным штаммом. Сохраняют вакцинный штамм при температуре минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ в лиофилизированном виде. Через каждые 3 года штамм периодически «освежают» в субкультуре клеток почки ягненка с последующей лиофилизацией. Титр вируса вакцинного штамма за указанный срок хранения может снизиться в пределах $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При этом допускается не более 10-кратное его пассирование.

Последующую серию вакцинного штамма готовят из лиофилизированного вируса в количестве 150-200 ампул. Отбирают необходимое количество матрасов с выросшей субкультурой почки ягненка 5-10 суточного возраста для «освежения» вируса. В субкультуре не должно быть каких-либо признаков спонтанной дегенерации клеток (отслоения клеток от стекла, вакуолизация клеток, очаги разрушения клеток, зернистость, изменения характерной формы клеток).

Для начала берут 2-4 ампулы, содержащие по 2 см^3 лиофилизированного вируса, содержащее их разводят в 10-кратном объеме поддерживающей среды. Среду выращивания из матрасов с субкультурой клеток сливают и в них вносят разведенный вирус в объеме по 20 см^3 в 1,5 литровые матрасы. Инфицированные субкультуры выдерживают в термостате при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч с периодическим орошением поверхности матраса монослоя клеток внесенным вирусом. После этого в сосуды вводят поддерживающую среду по 200 см^3 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 $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Через каждые 3 суток проводят смену среды в матрасах. Развитие вируса в субкультуре 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 $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. В контрольных матрасах не должно быть каких-либо деструктивных изменений клеток. На следующие сутки, замороженные субкультуры оттаивают при комнатной температуре, из каждого матраса берут пробы в количестве по 5 см^3 для проверки на отсутствие бактериального загрязнения и определения активности вируса. Вирусную суспензию до получения результатов контроля на стерильность и определения активности хранят при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 15 суток. При активности вируса не ниже $10^{-6,0} \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ стерильный вирусосодержащий материал используют для приготовления серии вакцинного вируса. С этой целью содержимое стерильных матрасов сливают в один сосуд, добавляют стабилизирующий раствор, охлажденный до $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$, в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД, стрептомицин 500 мг на 1 дм^3 смеси.

Приготовленную смесь разливают в стерильные ампулы по 2 см^3 и ставят в металлические кассеты, которые устанавливают на предварительно охлажденные до температуры минус $10-20^\circ\text{C}$ полки штатива.

Штатив помещают в низкотемпературную камеру и проводят замораживание содержимого ампул до температуры $57-58^{\circ}\text{C}$ в течение 8-12 часов. Затем штатив с ампулами переносят в охлажденную камеру вакуумной сублимационной установки. После высушивания ампулы запаивают при остаточном давлении от 15 ПА до 30 ПА.

Препарат в ампулах до заключения о его качестве сохраняют при температуре $(4\pm 1)^{\circ}\text{C}$. При получении положительных результатов ампулы этикетировывают, упаковывают и закладывают на хранение при температуре $(4\pm 1)^{\circ}\text{C}$.

Проверка качества вакцины

Вакцинный штамм подвергают техническому и биологическому контролю. Через каждые 5 пассажей штамм проверяют на специфичность в реакции нейтрализации, на способность вируса размножаться в субкультуре клеток почки ягненка с характерными цитопатическими изменениями и накапливаться в ней в титрах $10^{5,5} - 10^{6,0}$ ТЦД₅₀/см³.

Для проверки специфичности вакцинного штамма используется иммунная сыворотка, полученная от овец на 21 сутки после введения вируса штамма «Кул». Сыворотка должна быть стерильной, вируснейтрализующая активность ее должна составлять не ниже $2,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Специфичность цитопатического действия вируса проверяют одновременно с его титрованием.

В качестве контрольного используют вирулентный штамм «А» вируса оспы овец, представляющий собой 20 % тканевую вирусосодержащую суспензию. При внутрикожном введении в подхвостную складку неиммунных к оспе овец в дозе от 500 до 1000 ИД₅₀ в объеме $0,5 \text{ см}^3$ вирус этого штамма вызывает в месте введения на 4-6 сутки образование воспалительного отека в виде припухлости, достигающей размера от 4 до 8 см в диаметре, температура тела животных в это время повышается до 42°C . Заболевание в 50-80 % случаев сопровождается генерализацией оспенного процесса, которая характеризуется появлением оспенной сыпи, особенно заметной на бесшерстных участках кожи, серозным истечением из глаз, носовых полостей, затрудненным дыханием, опуханием суставов конечностей, кератитами. В 5-20 % случаев заболевание заканчивается летальным исходом. Клинические признаки болезни (местная кожная реакция и гипертермия) наблюдается у всех зараженных животных.

Биологическая активность вируса оспы овец, штамма «А» должна быть не ниже $10^{3,5}$ ТЦД₅₀/см³.

Пример.

Процесс получения вирусосодержащей суспензии производственного вируса оспы овец из штамма «Кул» включает следующие операции:

- отбор сосудов с выросшей субкультурой клеток почки ягненка;
- инфицирование сосудов вирусом;
- инкубирование зараженных сосудов;
- микроскопия;
- отбор сосудов для замораживания, взятие проб для контроля на стерильность и замораживание при минус $(40\pm 1)^{\circ}\text{C}$;
- оттаивание;
- слив вирусосодержащего материала в одну емкость;
- определение биологической активности вируса.

Для получения вакцины используют выращенную в матрасах субкультуру клеток печени ягненка с хорошим монослоем 3-4 суточного возраста.

Для изготовления одной серии аттенуированной вакцины необходимо получить как минимум 2 литра вирусной суспензии. Для этого берут 12 клинских матрасов емкостью $1,5 \text{ дм}^3$ с субкультурой клеток, в них вносят $(190\pm 20) \text{ см}^3$ вирусной суспензии разведенной поддерживающей средой (доза заражения $0,05-0,06$ ТЦД на клетку). Зараженные матрасы культивируют в стационарном положении при температуре $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Срок культивирования вируса в круговых сосудах 3-4 сутки без смены среды. Для контроля незараженными оставляют по 2 сосуда, которые поддерживают в одинаковых условиях с инфицированными. Начиная со 2 суток инкубирования, инфицированные сосуды ежедневно микроскопируют.

Сосуды, в которых наблюдаются цитопатические изменения на 65-80 % клеточного монослоя (обычно на 3-4 суток), отбирают из каждого сосуда, делают высевы на стерильность, замораживают при минус $(40\pm 1)^{\circ}\text{C}$, 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 актив-

ности. Титр вирусодержащей суспензии должен быть не ниже $10^{-6,0}$ ТЦД₅₀/см³. Вирусодержащую суспензию до получения результатов по определению биологической активности хранят при температуре 4°C не более 15 суток.

Примерный расчет потребности основных компонентов для приготовления одной серии вакцины:

- 14 матрасов субкультуры клеток почки ягненка, раствор Хенкса – 1500 см³; 0,02 %-ный раствор ЭДТА (версен) – 140-160 см³; среда Игла – 5600 см³; сыворотка крупного рогатого скота – 560 см³; 8,0 % раствор соды (двууглекислого натрия), антибиотики и антибактериальные препараты (Линкомицин, гентамицин, нистатин) по мере необходимости, вирусодержащая расплодка – 280 см³; стабилизатор триголаза – 0,5 кг. На брак допускается 10 % материалов.

К вирусодержащей культуральной жидкости добавляют защитную среду, охлажденную до (4±1)°C, в соотношении 1:1 с антибиотиками. Содержимое сосуда тщательно перемешивают. Смесь разливают при помощи специальных дозирующих аппаратов или шприцами-автоматами по 2 см³ в стерильные ампулы или флаконы по 2 см³.

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

Технология получения сухой аттенуированной вакцины сублимационным методом состоит из предварительного замораживания смеси вирусодержащей суспензии с защитной средой, разлитой в ампулы или флаконы, и последующего удаления влаги из замороженного состояния в вакууме на стерильной морозильной вакуумной 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 впуске воздуха или в вакуумной установке и обкатывают металлическими колпачками. Запаенные 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 аттенуированная вакцина против оспы овец включает в себя субкультуру клеток почек ягненка, среду Игла, раствор Хэнкса, защитную среду, антибактериальные и противогрибковые препараты, отличающаяся тем, что содержит в своем составе местный адаптированный специфический штамм "Күл" и стабилизатор триголаза, репродуцированный на первичной культуре клеток почки ягненка титром $10^{5,5} - 10^{6,0}$ ТЦД₅₀/см³.

Выпущено отделом подготовки материалов