



(19) KG (11) 1359 (13) C1 (46) 31.05.2011

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(51) A61K 39/135 (2011.01)
C12N 7/00 (2011.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя

(21) 20090145.1

(22) 22.12.2009

(46) 31.05.2011, Бюл. №5

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

(72) Нургазиев Р.З., Джапаралиев Н.Т., Абдыкеримов Н.К., Отрова А.А., Сааданов И.У. (KG)

(56) Патент KG №688, C1, кл. A61K 39/135, C12N 7/00, 2003

(54) Штамм "Иссык-Куль-2004" вириуса ящура типа О

(57) Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, к изготовлению биологического препарата, вакцины и диагностических средств.

Задачей изобретения является получение местного штамма вириуса ящура, обладающего высокой иммуногенной и биологической активностью, которая дает возможность изготовления вакцин и диагностических препаратов.

Поставленная задача получения штамма «Иссык-Куль-2004» вириуса ящура типа О, семейство Picornaviridae, род Aphtovirus, серотип О, для изготовления диагностических и вакцинальных препаратов решается путем выделения нового штамма, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью и пригодного для изготовления средств специфической профилактики и диагностики ящура типа О, гомологичных эпизоотическому вириусу, циркулирующему в странах Закавказья и Ближнего Востока.

Штамм «Иссык-Куль-2004» вириуса ящура типа О по антигенному и иммунологическому спектрам является оригинальным, в таксономическом отношении новым, ранее неизвестным вариантом вириуса ящура типа О. 1 н. п. ф.

(21) 20090145.1

(22) 22.12.2009

(46) 31.05.2011, Bull. №5

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

(72) Nurgaziev R.Z., Dzhaparaliev N.T., Abdykerimov N.K., Otorova A.A., Saadanov I.U. (KG)

(56) Patent KG №688, C1, cl. A61K 39/135, C12N 7/00, 2003

(54) Strain "Issyk-Kul-2004" of foot-and-mouth disease virus type O

(57) The invention relates to the field of veterinary virology, to the manufacture of biological preparation, vaccine and diagnostic agents.

Problem of the invention is to obtain the local strain of foot-and-mouth disease (FMD) virus, which has high immunogenic and biological activity and which will enable the production of vaccines and diagnostic products.

The assigned problem of obtaining the strain "Issyk-Kul-2004" of FMD virus type O of Picornaviridae family, Aphtovirus genus, serotype O, for manufacturing of diagnostic and vaccinal prepara-

(19) KG (11) 1359 (13) C1 (46) 31.05.2011

tions is solved by separation of a new strain, which possesses high biological, antigenic and immunogenic activity and it is suitable for manufacture of mediums for specific prevention and diagnosis of FMD type O, which(mediums) are homologous to epizootic virus, circulating in the Caucasus and the Middle East countries.

Strain "Issyk-Kul-2004" of FMD virus type O is the original, according to its antigenic and immunologic spectrum, taxonomically new and previously unknown variant of FMD virus type O. 1 indep. claim.

Штамм «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О относится к области ветеринарной вирусологии может применяться для производства средств специфической профилактики и лабораторной диагностики ящура. Наиболее близкими к предполагаемому изобретению является штамм вируса ящура «Белек-2001» для изготовления диагностических и вакцинальных препаратов (Патент KG №688, С1, кл. A61K 39/135, C12N 7/00, 2003).

Штамм вируса ящура «Белек-2001» недостаточно вырабатывает иммунитет у вакцинированных животных. Об этом свидетельствует тот факт, что в 2004 году в Иссык-Кульской и Нарынской областях были зарегистрированы случаи заболевания крупного рогатого скота ящуром, которые были вакцинированы трехвалентной вакциной против ящура (из серотипов О, А, Азия-1), в составе которого имелся штамм вируса ящура «Белек-2001».

Задачей создания изобретения является получение нового штамма, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногеной активностью.

Поставленная задача изобретения штамма «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О, семейство Picornaviridae, род Aphtovirus, серотип О для изготовления диагностических и вакцинальных препаратов решается получением нового производственного штамма «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногеной активностью и пригодного для изготовления средств специфической профилактики и диагностики ящура типа О, гомологичных эпизоотическому вирусу, циркулирующему в странах Закавказья и Ближнего Востока.

Источник получения штамма

Материалы для исследований были взяты у больных животных (афтозный материал) в Иссык-Кульской области во время вспышки. Патологический материал отбирали с учетом всех ветеринарно-санитарных правил.

Морфологические свойства

Штамм вируса ящура – нуклеотид сферической формы, икосаэдр с наружным диаметром 22-24 нм. Вирион состоит из молекулы РНК, заключенной в белковую оболочку.

Белковая оболочка состоит из 32 капсомеров, расположенных в кубической симметрии. Вирус ящура размножается в организме одно-трехдневных крольчат в культурах клеток, почке сирийского хомячка (ВНК-21) и др., в течение 20-24 часов инкубирования накапливается до 7,0-8,0 lg ТЦД₅₀/мл. При массированном заражении вызывает ЦПД через 4 часа. После 3-4 пассажей инкубирования накапливается до 6,0-9,0 lg ТЦД₅₀/мл. Сохраняет исходные характеристики при пассировании в чувствительных биологических системах в течение 10 пассажей. Штамм устойчив к внешним факторам, к эфиру и другим органическим растворителям. Чувствителен к формальдегиду, высоким температурам, УФ-облучению. Стабилен при pH 7,2-7,4. Сдвиги pH как в кислую, так и в щелочную сторону ведут к инактивации вируса.

Антигенные свойства

По своим антигенным свойствам штамм «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О относится к серотипу О. Вирус стабильно нейтрализуется гомологичной антисывороткой. Вирус не проявляет гемагглютинирующую активность. У переболевших животных в сыворотке крови образуются антитела, выявляемые в реакции диффузной преципитации (РДП), иммуноферментного анализа (ИФА), реакции нейтрализации (РН). При вакцинации крупного рогатого скота вакциной из инактивированного вируса индуцирует образование специфических антител, выявляемых в ИФА, РДП, РН. При гипериммунизации морских свинок концентрированным инактивированным вирусом индуцирует образование вирусспецифических антител, выявляемых в РСК в разведении 1: 256 и в ИФА в разведении 1: 6000.

Дополнительные признаки и свойства

Иммуногенная активность – иммуногенен в составе инактивированной вакцины.

Реактогенность – реактогенными свойствами не обладает.

Патогенность – патогенен для парнокопытных животных, новорожденных мышат, морских свинок.

Вирулентность – вирулентен для естественно-восприимчивых животных при контактном, аэрозольном и парентеральном заражении.

Стабильность – сохраняет исходные биологические свойства при пассировании в чувствительных биологических системах в течение 10 пассажей.

Исходя из полученных данных, можно утверждать, что штамм «Иссык-Куль-2004» вириуса ящура типа О по антигенному и иммунологическому спектрам является оригинальным, в таксономическом отношении новым, ранее неизвестным вариантом вириуса ящура типа О.

Для снижения его эпизоотической опасности необходимо обеспечить своевременную лабораторную диагностику и вакцинопрофилактику вновь возникающих очагов болезни, для чего необходимы высокоактивные и специфичные антителные и антигенные диагностикумы и вакцина, полученные с использованием данного штамма в качестве производственного.

Приготовление вакцины против ящура из типа О

Штамм «Иссык-Куль-2004» вириуса ящура типа О был изолирован из полевого материала, поступившего в Кыргызский научно-исследовательский институт ветеринарии имени А. Дуйшева (НИИВ) в виде поражения слизистой оболочки ротовой полости (эпителия афт) крупного рогатого скота (КРС), подозреваемого в заболевании ящуром, при проведении лабораторной диагностики этого заболевания и дифференциации его от других везикулярных болезней. При изоляции вириуса использован комплекс биологических, вирусологических и биохимических методов. Биологические и вирусологические методы включали интранадермопингвальную инокуляцию материала полевого изолята КРС (1 пассаж) и последующую адаптацию вириуса, выделенного от заболевшего животного, к культурам первично-трипсинализированных и перевиваемых линий клеток. Были использованы культуры клеток почек телят, почек ягненка и ВНК-21. Первичные и перевиваемые культуры клеток для постановки биопробы выращивали на соответствующих питательных средах. Культуры клеток заражали по 30 пробирок, внося по 0,2 см³ исследуемого материала. Зараженные культуры клеток ставили на 1 час при (37±0,5)°С. Через час заражающий материал сливали и в пробирки вносили 1 см³ питательной среды. В качестве контроля брали 4 пробирки с культурой клеток той же партии, в которые вносили по 1 см³ только поддерживающей среды. Зараженные и контрольные пробирки с культурой клеток инкубировали в стационарном положении при (37±0,5)°С, смену среды проводили через каждые 2 сутки.

Культуры клеток через 120 часов после заражения замораживали при минус 40°С, а затем оттаивали при комнатной температуре, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин и брали пробы для определения титра в РСК. Проводили по 4 последовательных слепых пассажа на культурах клеток, почек телят, почек ягнят и ВНК-21.

В результате исследований стало известно, что наиболее чувствительной культурой является ВНК-21.

Адаптация выделенного изолята на культурах клеток

Для адаптации вириуса ящура использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21. Для заражения культуры клеток использовали матрасы с хорошо выраженным монослоем. Перед заражением культуры клеток, удаляли питательную среду (10 % среда роста) и в каждый матрас вносили определенное количество вириуса при температуре термостата +37°С. Кроме того, в матрас вносили 150-180 мл поддерживающей питательной среды (Игла, 199 и др.), одновременно оставляя незараженным один матрас для контроля. Сыворотка, входящая в состав питательных сред, должна быть прогрета до 56°С в течение 30 мин и проверена на стерильность. Температура и срок инкубации культур клеток определяется свойствами вириуса. В инфицированных культурах клеток в течение инкубации питательную среду можно не менять, а оптимальное значение pH (7,2-7,6) поддерживают подщелачиванием раствора NaHCO₃. Для выявления морфологических изменений в зараженных культурах клеток их ежедневно просматривали под малым увеличением микроскопа. Индикатором наличия вириуса в зараженных культурах клеток служили:

1. развитие специфической дегенерации клеток;
2. обнаружение внутриклеточных включений;
3. обнаружение специфического антигена методом иммуно-флюоресценции.

Определение титра инфекционности на мышатах-сосунах 4-6 дневного возраста противоящурной вакциной типа «О»

В ряд стерильных пронумерованных пробирок (с №1 по №10) разлили 9 см³ стерильного забуференного физраствора (pH 7,4) и делали возрастающие 10-кратные разведения супензии.

Каждым разведением суспензии, начиная с 10^{-3} степени, заразили 4 мышат-сосунов в дозе 0,1 см³. Суспензию вводили подкожно в область спины одним шприцом, начиная с введения 10^{-10} и заканчивая самым низким 10^{-3} разведением.

Срок наблюдения за подопытными мышатами составляет 5 суток. Титр вируса вычисляли по методу Кербера-Ашмарина и выражали в логарифмах.

Таблица 1

Антигенный спектр штамма вируса ящура типа О «Иссык-Куль-2004»

Сравниваемые штаммы	Показатели		
	r_1	r_2	R %
О «Иссык-Куль-2004» и О «Белек-2001»	0,88	0,91	89

Данные показатели свидетельствуют о том, что штамм «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О отличается от штамма вируса ящура «Белек-2001».

Таблица 2

Инфекционность 10 % вирусодержащей суспензии

Тип	Разведение в титрах								Титр инфекционности
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	
О	++++	++++	++++	++++	++++	+++-	+++-	+---	9,25

Титр инфекционности для типа О составил 9,25, что свидетельствует об инфекционности данной суспензии.

Вакцина против ящура из культурального вируса по своим физическим и иммунобиологическим свойствам соответствовала требованиям, указанным в таблице 3.

Таблица 3

Иммунобиологические показатели вакцины из штамма «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О

Наименование показателей	Характеристика и нормы	Результат испытаний
Внешний вид	Бесцветная или розоватая жидкость с осадком адсорбента, который легко разбивается в равномерную взвесь при встряхивании	соответствует
Наличие посторонних примесей, плесени, трещин флаконов	Не допускается	отсутствует
Стерильность	Не должно быть контаминаントов	стерильна
Безвредность и токсичность	Безвредна, не токсична	Безвредна, не токсична
Авирулентность	Авирулентна	авирулентна
Иммуногенность	Иммуногенна	иммуногенна

Пример

Процесс получения ВНК супензионных клеток из штамма «Иссык-Куль-2004» вируса ящура типа О включает следующие операции:

- отбор сосудов с выросшей субкультурой клеток ВНК-21;
- инфицирование сосудов вирусом;
- инкубирование зараженных сосудов;
- микроскопия;
- отбор сосудов для замораживания, взятие проб для контроля на стерильность и замораживание при минус $(40\pm1)^\circ\text{C}$;
- оттаивание;
- слив вирусодержащего материала в одну емкость;
- определение биологической активности вируса.

Для получения вакцины используют выращенную в матрасах субкультуру клеток ВНК-21 с хорошим монослоем.

Полученную матричную расплодку вируса используют для наработки вирусного сырья. Заражение клеточных культур и сбор вирусного материала проводят по общепринятой методике.

ВНК супензионные клетки получены в лаборатории по выращиванию культур клеток, которые культивировались в биореакторах от 60 до 4500 литров с использованием стерильной питательной среды.

Вирусный материал штамма О был получен из 60 литровых инфицированных культуральных емкостей.

Выращенные клетки в 4500 литровых емкостях охлаждаются, седиментируются и ресус-пендируются в среде для выращивания вируса.

Затем 4500 л емкости инфицируются и оставляют на 48 часов для накопления вирусной массы.

После 48 часов вирусная культура осветляется и фильтруется в инактивационные емкости и добавляют азиридин для инактивации и оставляют на 48 часов с дозированием с 24 часовым интервалом. Инактивированный антиген затем очищается и концентрируется ультрафильтрацией и собирается в передвижные емкости. Ассептично добавляется требуемое количество 10 % тиомер-сала, 50 % тиосульфатной соды и фосфатно-буферный разбавитель. Далее добавляют равное количество минерального масла ISA Montanide 206, то есть к 2 литрам антигена добавляют 2 литра масла. Используя гомогенизатор, осторожно мешают компоненты при 400 об/мин в течение 20 минут. Далее оставляют смесь при 4°C на ночь для повторной гомогенизации на следующий день.

После получения результатов из отдела биологического контроля, эмульгированная смесь заполняется как вакцина автоматической линией розлива и ставится на карантин до прохождения полного контроля. Также отбираются несколько образцов для контроля.

После прохождения всех контролей на стерильность и безопасность в отделе биологического контроля, флаконы этикетируются и наносятся надписи содержащие номер лицензии, номер серии и контроля, дату изготовления и окончания срока годности.

Формула изобретения

Штамм вируса ящура типа О "Иссык-Куль-2004", семейство Picornaviridae, род Aphtovirus, серотип О, для изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Выпущено отделом подготовки материалов