

(19) **KG** (11) **1361** (13) **C1** (46) **31.05.2011**ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ(51) **A61K 39/205** (2011.01)**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ****к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя**

(21) 20100001.1

(22) 11.01.2010

(46) 31.05.2011, Бюл. №5

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

(72) Акматова Э.К., Джапаралиев Н.Т. (KG)

(56) Патент RU 2191600, A61K 39/205, 2002

(54) **Штамм "Сузак-2008" инактивированная культуральная вакцина против бешенства**

(57) Изобретение относится к ветеринарной вирусологии, к изготовлению вакцинных и диагностических средств.

В задачу создания настоящего изобретения входило получение нового производственного штамма вируса бешенства «Сузак-2008», обладающего высокой биологической и иммуногенной активностью, обеспечивающего изготовление диагностических и вакцинных препаратов.

Поставленная задача получения штамма вируса бешенства животных семейства *Rhabdoviridae*, рода *Lyssavirus*, который используется для изготовления диагностических и вакцинных препаратов решается путем выделения нового производственного штамма «Сузак-2008» из пораженных клеток головного мозга больных животных и адаптацией вируса на культуре клеток ВНК-21, "Marc"-145 и клетки "Vero", обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью и пригодного для изготовления диагностических и вакцинных препаратов. 1 н. п. ф.

(21) 20100001.1

(22) 11.01.2010

(46) 31.05.2011, Bull. №5

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

(72) Akmatova E.K., Dzhaparaliev N.T. (KG)

(56) Patent RU 2191600, A61K 39/205, 2002

(54) **Strain "Suzak 2008" as an inactivated culture vaccine against rabies**

(57) The invention relates to veterinary virology, to the production of vaccinal and diagnostic preparations.

Problem of the present invention was the obtainment of a new production strain of rabies virus "Suzak-2008", which possesses high biological and immunogenic activity, providing the manufacture of diagnostic and vaccinal preparations.

The assigned problem to obtain the strain of animals rabies virus of *Rhabdoviridae* family, *Lyssavirus* genus, which is used for manufacture of diagnostic and vaccinal preparations is solved by separation of a new production strain "Suzak-2008" from the affected brain cells of sick animals and adaptation of the virus in cells' culture VNA-21 (virus nucleic acid), "Marc-145" and "Vero" cell, which

(19) **KG** (11) **1361** (13) **C1** (46) **31.05.2011**

has(strain "Suzak-2008") high biological, antigenic and immunogenic activity and is suitable for manufacture of diagnostic and vaccinal preparations. 1 independ. claim.

Изобретение относится к ветеринарной вирусологии, к изготовлению вакцинных и диагностических средств.

Наиболее близким к предполагаемому изобретению является штамм «Щелково 51» (Патент RU 2191600, А61К 39/205, 2002).

Недостатком штамма «Щелково 51» является низкая биологическая, антигенная и иммуногенная активность в условиях Кыргызской Республики.

В задачу создания настоящего изобретения входило получение нового производственного штамма вируса бешенства, обладающего высокой иммуногенной и биологической активностью, обеспечивающего изготовление диагностических и вакцинных препаратов.

Поставленная задача получения штамма «Сузак-2008» вируса бешенства животных семейства *Rhabdoviridae*, рода *Lyssavirus*, для изготовления диагностических и вакцинных препаратов решается выделением нового производственного штамма «Сузак-2008» из пораженных клеток головного мозга больных животных и адаптацией вируса на культуре клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21), клетки поджелудочной железы свиней ("Marc"-145) и почки зеленой мартышки (клетки "Vero") обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью и пригодного для изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

Источник получения штамма

Исходный вирус для получения штамма «Сузак-2008» вируса бешенства был выделен из патологического материала от больных собак во время вспышки заболевания в 2008 году в Сузакском районе, Джалал-Абадской области. Вакцинный штамм «Сузак-2008» вируса бешенства был получен путем многократных последовательных пассажей на перевиваемой культуре клеток ВНК-21, "Marc"-145 и клетки "Vero". В ходе исследований экспериментально подтверждена его возможность использования для приготовления диагностических препаратов и вакцины.

Морфологические свойства

Вирус бешенства относится к семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*,

Рабдовирусы – это большая группа вирусов, выделенных от позвоночных животных, членистоногих и растений.

Большинство вирионов имеют форму пули с одним круглым, одним плоским концом. Длина и диаметр вирусных частиц варьирует в больших пределах и в среднем составляет 180 x 75 нм. Вирус состоит из волокнистого ядра, окруженного двумя мембранами различной плотности. Поверхность вириона имеет выступ длиной 6-7 нм и диаметром 4,5-5,5 нм.

На плоском конце вириона, имеется осевая полость глубиной не более 1/3-1/5 его общей длины. Плотность вируса составляет 1,16 - 1,20 г/см³. Константы седиментации – 550-650S (рибосом), молекулярная масса 475 x 10⁶ Дальтон.

РНК вируса бешенства имеет молекулярную массу 4,6 x 10⁶ Дальтон, что составляет 2 % массы вириона. Геном представлен единой нефрагментированной молекулой нуклеиновой кислоты, что и объясняет отсутствие биологической активности у РНК, выделенной из вируса бешенства. Длина РНК вируса 460 нм, константа седиментации 45 S, плавучая плотность 1,66 г/см³.

Получение штамма

Для получения штамма «Сузак-2008» требуется:

- фиксированный вирус бешенства штамм «Сузак-2008», адаптированный к суспензионной культуре клеток ВНК-21/2, с титром инфекционности – 6,0-6,5 lg ЛД₅₀/МЛ;
- овцы в возрасте 1-1,5 года;
- белые мыши массой 10-12 грамм;
- крупный рогатый скот массой 250-300 кг;
- собаки беспородные в возрасте 2-х месяцев;
- питательные среды и антибиотики;
- суспензионная и монослойная культура клеток ВНК-21/2, клетки "Marc"-145, клетки "Vero".

С технологической точки зрения при промышленном производстве антирабических вакцин наибольший интерес представляет высокая эффективность выращивания клеток и максимальный выход вируса.

Высокое накопление вируса бешенства обеспечивается при культивировании в суспензионной культуре клеток ВНК-21.

При высоком выходе вируса бешенства отсутствует необходимость в концентрировании антигена.

Кроме того, для получения качественных антирабических вакцин необходимо подобрать штамм вируса, обладающий высокой иммуногенной активностью, отработать метод очистки и концентрирования вируса, подобрать инактивант, обеспечивающий устранение инфекционности, с сохранением иммуногенности, а также подобрать адъюванты усиливающие иммуногенный ответ организма животных на введение вакцины.

Процесс культивирования вируса проводили двумя способами:

1. Стационарным – в течение 4-6 суток;
2. Циклическим – отъемно-доливным – в течение 6 суток с разведением оставшейся суспензии в два раза через каждые 48 часов.

Культивирование вируса прекращали при стационарном способе, когда при контроле оставалось 50-70 % жизнеспособных клеток, а при циклическом методе культивирования, когда оставалось 80-90 % жизнеспособных клеток.

Овец инфицировали интрацеребрально культуральным вирусом штамма «Сузак-2008» в дозе 0,5 мл, с титром не ниже 6,5 lg ЛД₅₀/мл. На 5-7 сутки, в атональной стадии, овец обескровливали с соблюдением асептики и антисептики, извлекали головной мозг. Готовили 10 % суспензию на ФБР-рН-7,0-7,2, центрифугировали и надосадочную жидкость разливали по флаконам и хранили при температуре -40°C.

Титр инфекционности вируса определяли на белых мышах массой 10-12 граммов. Для этого готовили 10-кратные разведения суспензии мозга на фосфатно-буферный раствор (ФБР) (10⁻¹ до 10⁻⁷) и каждым разведением заражали 4 белых мышей интрацеребрально в дозе 0,03 мл. За животными вели наблюдение 14 дней. Титр инфекционности рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина.

Для удаления клеточного детрита из культуральной жидкости использовали низкоскоростное центрифугирование и мембранную фильтрацию, применяя капроновые мембраны с диаметром пор 200 нм на ультрафильтрационной установке (УФУ).

Степень очистки вирусосодержащей жидкости от чужеродного белка клеток при первом способе составила 10 %, при втором – 19 %. Титр вируса в обоих случаях не снизился.

Для концентрирования вируса из вирусосодержащей жидкости были использованы универсальная ацетатно-целлюлозная мембрана УАС-600 и ацетатно-целлюлозная мембрана АЦ-300 с диаметром пор не более 60 нм. Вирус концентрировали от 2 до 400 раз.

В опытах было установлено, что для концентрирования вируса бешенства наиболее приемлемы мембраны АЦ-300. Потери вируса при использовании мембран АЦ-300 не превышали 5 % при 100 кратном концентрировании.

Штамм вируса бешенства концентрировали в 10, 50 и 100 раз с добавлением 2 % яблочного пектина и пептон-лактозную стабилизирующую среду 1:3, гентамицина 0,1 г на 1 л, фасовали и лиофильно сушили.

Проверка на стерильность заключается в определении отсутствия роста бактериальной и грибковой микрофлоры в посевах образцов вакцины или вирусосодержащей суспензии, или антигена на питательных средах. Для проведения испытания на стерильность пробу вакцины или вирусосодержащей суспензии встряхивают и проводят посев. В посевах не должно быть роста бактериальной и грибковой микрофлоры.

Пример

Культуральные вакцины содержат незначительные количества балластных примесей в вирусосодержащей жидкости. Культуральную вирусосодержащую жидкость легко очищать и концентрировать и готовить безвредные и высокоиммуногенные вакцины против бешенства.

Культуральные инаktivированные вакцины против, бешенства готовят по следующей технологической схеме:

- подготовка и выращивание на культуре клеток ВНК-21/2;
- подготовка адаптированного к культуре клеток вируса бешенства;
- заражение культуры клеток адаптированным вирусом бешенства;
- выращивание вируса бешенства в культуре клеток;
- сбор вирусосодержащей культуральной жидкости;
- очистка и концентрирование вирусосодержащей культуральной жидкости;

- инаktivация инфекционности вируса в вируссодержащей жидкости;
- добавление в вируссодержащую жидкость стабилизаторов и адъювантов.

При изготовлении сухих вакцин против бешенства следующим этапом будет лиофильное (в условиях вакуума) высушивание полученной смеси.

При использовании для культивирования вируса бешенства первично-трипсинизированных клеток в качестве их источника применяют почки различных животных. Этот метод очень трудоемкий и малопроизводителен, а также постоянно требует животных-доноров.

Определение иммуногенности вакцины из штамма «Сузак-2008»

Метод заключается в количественном определении иммуногенности штамма относительно международного стандарта. Иммуногенность вакцины определяют объемным методом. Для этого пробы вакцины из штамма «Сузак-2008» тщательно перемешивают и делают четыре последовательных разведения с пятикратным шагом (1:5; 1:25; 1:125; 1:625) стерильным физиологическим раствором. Разведенные образцы вакцины сохраняют в сосуде со льдом.

Каждое разведение испытуемой вакцины вводят по 0,5 мл внутривентрально 16 мышам двукратно с недельным интервалом. 40 невакцинированных мышей из этой группы сохраняют для титрования тест-штамма вируса.

Через 7 суток после второй вакцинации мышам вводят 0,03 мл интрацеребрально разрезающую дозу штамма «Сузак-2008», содержащую по предварительному титрованию 5-50 ЛД_{50/0,03} мл.

За мышами ведут наблюдение в течение 14 дней. Одновременно на 40 невакцинированных мышах проводят контрольное титрование вируса, взятого для заражения. Для этого основное разведение вируса штамма «Сузак-2008» вводят по 0,03 мл интрацеребрально 10 мышам. Из основного разведения делают разведения (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) стерильным физиологическим раствором. Каждым разведением заражают интрацеребрально по 10 мышей в дозе 0,03 мл. Дозу вируса рассчитывают по методу Рида и Менча (метод подсчета индекса нейтрализации вирусов).

Формула изобретения

Штамм "Сузак-2008" вируса бешенства животных семейства Rhabdoviridae, рода Lyssavirus, который используется для изготовления диагностических и вакцинных препаратов.

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