



(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. Дуйшеве (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 вакцины 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 вакциных препаратов.

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

(72) Akmatova E.K., Dzhabaparaliev 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 вакцинальных и диагностических средств.

Наиболее близким к предполагаемому изобретению является штамм «Щелково 51» (Патент RU 2191600, A61K 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 вакцинальных препаратов.

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

Радовирусы – 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 Ig LD₅₀/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 монослоистая 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 супензионной 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 адьюванты 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 супензии 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 LD₅₀/мл. На 5-7 сутки, в атональной стадии, овец обескровливали с соблюдением асептики и антисептики, извлекали головной мозг. Готовили 10 % супензию 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 супензии 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 центрифugование и мембранный фильтрацию, применяя капроновые мембранные с диаметром пор 200 нм на ультрафильтрационной установке (УФУ).

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

Для концентрирования вируса из вируссодержащей 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 мембранны 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 вируссодержащей супензии, или антигена на питательных средах. Для проведения испытания на стерильность пробу вакцины или вируссодержащей супензии встраивают и проводят посев. В посевах не должно быть роста бактериальной и грибковой микрофлоры.

Пример

Культуральные вакцины содержат незначительные количества балластных примесей в вируссодержащей жидкости. Культуральную вируссодержащую жидкость легко очищать и концентрировать и готовить безвредные и высокомимуногенные вакцины против бешенства.

Культуральные инактивированные 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 вируссодержащей культуральной жидкости;
- очистка и концентрирование вируссодержащей культуральной жидкости;

- инактивация инфекционности вируса в вируссодержащей жидкости;
- добавление в вируссодержащую жидкость стабилизаторов и адьювантов.

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 внутрибрюшенно 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 разрешающую 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