



(19) **KG (11) 2000 (13) C1**
(51) **A01N 63/02 (2017.01)**

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И
ИННОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20160079.1

(22) 03.11.2016

(46) 30.12.2017, Бюл. № 12

(71) Институт биотехнологии НАН КР (KG)

(72) Жунушов А.Т.; Султаналиев Н. К.; Карыбек уулу С.; Касымбеков Ж. Б.; Бейшенова К. Б.
(KG)

(73) Институт биотехнологии НАН КР (KG)

(56) Патент RU № 2417262, кл. C12N 39/125, 27.04.2011

(54) Штамм "КБ-биотех" вируса геморрагической болезни кроликов для изготовления вакцинных и диагностических препаратов

(57) Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии.

Задачей настоящего изобретения является получение местного производственного и диагностического штамма вируса геморрагической болезни кроликов, сохраняющего свои иммунологические свойства после инактивации и пригодного для изготовления высокоиммуногенных вакцинных препаратов, диагностических систем (из неконцентрированного вируса).

Поставленная задача решается получением штамма вируса геморрагической болезни кроликов «КБ-биотех» семейства *Caliciviridae*, род *Lagovirus*, регистрационного наименования «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов, для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

1 н. п. ф., 3 пр., 4 табл.

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии и может быть использовано при изготовлении средств специфической профилактики и диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов.

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов - ВГБК (некротический гепатит, геморрагическая пневмония кроликов) - остропротекающая высококонтагиозная болезнь, которая характеризуется очень быстрым распространением среди взрослого поголовья кроликов с явлениями геморрагического диатеза во всех органах и сопровождающаяся высокой летальностью (80-100 %).

Возбудителем ВГБК является РНК-со-державший вирус, относящийся к роду *Lagovirus* семейству *Caliciviridae*, обладающий чрезвычайно высокой вирулентностью.

Вакцинопрофилактика ВГБК занимает основное место в комплексе противоэпизоотических мер, направленных на борьбу с этим заболеванием. Для вакцинопрофилактики вирусной геморрагической болезни кроликов применяют инаktivированные моно - и ассоциированные вакцины российского производства. Для изготовления инаktivированных вакцин против ВГБК в России используются штаммы «Воронежский-87», патент RU № 2071662, кл. A61K 39/295, 39/102, 39/125, 10.01.1997, и «Белгородский-03», патент RU № 2417262, кл. C12N 39/125, 27.04.2011.

Однако кролики привитые вакциной, приготовленной из ранее выделенных изолятов, имеют более низкую степень защиты против выделенных изолятов ВГБК.

Поэтому в Кыргызской Республике необходимо вести генетический мониторинг и сравнение гемагглютинирующих и иммунологических свойств местных изолятов ВГБК в очагах инфекции, но и иметь в музейных коллекциях штаммы вируса ВГБК, позволяющие изготавливать из них более эффективные средства специфической профилактики против ВГБК, исходя из эпизоотической ситуации.

Задачей настоящего изобретения является получение местного производственного и диагностического штамма вируса геморрагической болезни кроликов, сохраняющего свои иммунологические свойства после инактивации и пригодного для изготовления высокоиммуногенных вакцинных препаратов, диагностических систем (из неконцентрированного вируса).

Поставленная задача решается получением штамма вируса геморрагической болезни кроликов «КБ-биотех» семейства *Caliciviridae*, род *Lagovirus*, регистрационного наименования «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов, для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

Исходный вирус для получения штамма «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов был выделен во время вспышки 2016 г. в городе Кара-Балта Чуйской области Кыргызской Республики от больных и павших кроликов.

Производственный штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов получен путем последовательных пассажей на кроликах.

Полученный штамм содержится в лаборатории вирусологии Института биотехнологии НАН КР с 11 апреля 2016 года, под регистрационным шифром Штамм «КБ-биотех».

Штамм «КБ-биотех» отличается от ранее депонированных российских штаммов ВГБК «Воронежский-87» и «Белгородский-03» по нуклеотидным последовательностям консервативной области гена VP-60 длиной 398 пар нуклеотидов. Вышеуказанные штаммы, основываясь на результатах филогенетического анализа, относятся к разным геногруппам.

Штамм «КБ-биотех» обеспечивает проведение серологической диагностики вирусной геморрагической болезни кроликов и производство эффективной инактивированной вакцины против ВГБК, создающей надежную защиту диких и домашних европейских кроликов от указанного возбудителя заболевания.

Штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов характеризуется следующими признаками и свойствами:

Морфологические свойства

Возбудитель ГБК - РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству калицивирусов. Размер вириона 28-33 нм. Вирус кубической симметрии, имеет форму икосаэдра, электронноплотное ядро (20 нм). Величина вирусной РНК составляет примерно 8000 оснований.

Молекулярно-генетические свойства

В капсидах вируса 180 субъединиц, формирующих пентамер-гексамеры, 4 вирионных белка - VP1, VP2, VP3 и VP4 мол. м. 60-61, 54,7, 52 и 26-28 кД соответственно. VP1 - основной капсидный белок, на долю которого приходится 54,7 % массы капсидных белков. Нуклеотидная последовательность консервативной области гена VP60, длиной 398 пар нуклеотидов: позиция в геноме: 6340-G, 6346-A, 6347-A, 6354-G, 6355-A, 6357-C, 6369-T, 6372-A, 6380-G, 6381-T, 6384-T, 6393-C, 6398-A, 6405-G, 6409-G, 6410-C, 6411-T, 6412-G, 6413-C, 6417-G, 6438-G, 6460-T, 6461-A, 6462-C, 6498-G.

Патогенные свойства

Вирус проявляет высокую патогенность для домашних и диких европейских кроликов старше 2-мес. возраста при парентеральном способе заражения и не патогенен для остальных лабораторных животных.

Устойчивость

Вирус ГБК устойчив к обработке эфиром, хлороформом, к pH 3. Сохраняет инфекционную активность при 50 °C - 1 час, при 56 °C - 10 минут. Он сохраняется в суспензии инфицированной печени при температуре 4 °C в течение года, инактивируется 0,1 %-ным раствором формалина или теотропина при температурах 4°, 27°, 37 °C в течение суток. Сохраняется без снижения вирулентности при - 40-50 °C более 5 лет.

Ингибиторочувствительность

Устойчив к воздействию растворителей липидов (эфир, хлороформ, фреоны). Чувствителен к формалину, глутаровому альдегиду хлорсодержащим дезинфектантам, перекиси водорода, растворам щелочей.

Культуральные свойства и стандартные условия выращивания

Вирус воспроизводится *in vivo* на европейских домашних или диких кроликах, старше 1,5-2-мес. возраста, он так же репродуцируется в перевиваемой культуре клеток почки кролика.

Гемагглютинирующие (ГА) свойства

ГА-активность вируса ГБК связана с цельными вирионами. Суспензия из печени, селезенки, легких инфицированных животных агглютинирует эритроциты овец, птиц и человека. Наилуч-

шие результаты получены с эритроцитами человека 0 (1) группы при 37 °С и при 4 °С, не агглютинирует эритроциты морской свинки, петуха, свиньи.

Сохраняемость и условия хранения

Штамм стабилизируют обезжиренным молоком или другими стабилизаторами и хранят в лиофилизированном состоянии при температуре не выше минус 40 °С в ампулах под вакуумом. Вирус освежают пассированием его на кроликах один раз в пять лет.

Оригинальность и патентоспособность

Штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов по показателям инфекционности, антигенности и иммуногенности является оригинальным, новым, ранее не известным вариантом вируса ГБК.

Сущность предлагаемого изобретения показана на примерах получения штамма.

Пример 1

Для получения вируса ГБК штамм «КБ-биотех», использовали три ампулы с вирусом, на уровне второго пассажа на кроликах, павших от введения им 10 % суспензии печени от кроликов, павших в городе Кара-Балта в апреле 2016 года (инфекционная активность не ниже 10^4 ЛД₅₀/см³). В каждую ампулу вносили стерильный растворитель (дистиллированная вода или физиологический раствор, рН 7,2-7,6) до объема, указанного на этикетке. Затем содержимое ампул объединяли и из общей пробы готовили разведение вируса на физиологическом растворе таким образом, чтобы в конечном разведении содержалось 100 ЛД₅₀/см³. Указанное разведение вируса вводили внутримышечно 5 кроликам в объеме 1,0 см³. Инфицированных кроликов содержали в оборудованном инфекционном виварии в индивидуальных металлических клетках.

У инфицированных кроликов через 18-24 ч отмечали характерные клинические признаки болезни: угнетение, отказ от корма, повышение температуры тела до 40,8 °С, носовое кровотечение и гибель в течение 22-48 ч. Трупы животных погружали на 5-10 мин в раствор марганцевокислого калия (1:10000), затем во вскрыточной комнате инфекционного вивария подвешивали на вешалки, снимали шкурки, обрабатывали брюшную полость раствором марганцевокислого калия (1:10000), разрезали брюшные мышцы по белой линии, извлекали печень, отделяли желчный пузырь. Печень брали только от трупов, при вскрытии которых обнаружены специфические патологоанатомические изменения, свойственные ВГБК: геморрагии в трахее, геморрагическая пневмония, кровоизлияния под капсулой почек, селезенки, печень дряблой консистенции, которая легко рвется и имеет желто-коричневый цвет, местами с красноватым оттенком. Некроз печени и увеличение селезенки - первичные поражения. Острое поражение легких - результат венозного тромбоза, вызывающего острый отек, пенистый серозный или с примесью крови транссудат, который заполняет пеной трахею и выделяется постоянно из ноздрей. Инфаркты наблюдали почти во всех органах, а почки полностью инфарктны и имеют темно-коричневый цвет.

Образец печени измельчали ножницами, добавляли стерильный ФСБ (фосфатный буфер) (соотношение 1:10 - вес/объем), гомогенизировали в блендере при охлаждении в течение 10 мин. Отбирали в отдельную стерильную пробирку для идентификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР). В оставшийся материал вносили хлороформ (конечная концентрация 2 %) и помещали в камеру бытового холодильника на 18 ч при 4 °С. После чего суспензию печени центрифугировали в течение 1 ч при 6000 g при 4 °С. Супернатант ультрацентрифугировали при 80000 g в течение 2 ч при 4 °С, через 20 %-ный раствор сахарозы. Осадок ресуспендировали в ФСБ 1/100 от начального объема.

Для идентификации генома вируса ГБК использовали олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие участок гена VP60 длиной 398 п.о.

Смесь для обратной транскрипции: обратный праймер (10 пмоль) - 1,0 мкл, dNTP (10 mM) - 0,4 мкл, 5x буфер для ОТ («Амплисенс», Россия) - 5 мкл, ревертаза - 50 ед., РНК (исследуемый образец) - 5 мкл, деионизированная вода - до 20 мкл. Смесь для амплификации: смесь праймеров (10 pM каждого) - 2,0 мкл, dNTPs (10 mM) - 0,4 мкл, 5X ПЦР буфер Blue («Амплисенс», Россия) - 5 мкл, Taq ДНК-полимераза - 0,75 ед., кДНК (исследуемый образец) - 5 мкл, деионизированная вода - до 25 мкл.

Результаты исследования учитывали путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением бромида этидия.

Выделение специфических продуктов амплификации из агарозного геля осуществляли коммерческим набором для выделения нуклеиновых кислот «AxyPrep DNA Gel Extraction Kit» («Axygen», США).

Определение нуклеотидной последовательности фрагментов кДНК вируса ГБК осуществляли с помощью набора «BigDye v. 3.1. Terminator» («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130 («Applied Biosystems», США) согласно рекомендациям изготовителя.

Вирусосодержащий материал всесторонне исследовали в соответствии с рекомендациями МЭБ по стандартным диагностическим методам и вакцинам (2004) на отсутствие контаминации микоплазмами, бактериями и грибами путем посева на чувствительные питательные среды. Отсутствие контаминации посторонними вирусами и идентификацию вируса ГБК определяли методом негативного контрастирования электронной микроскопией. Определяли инфекционную активность на кроликах, гемагглютинирующую активность в РГА, антигенную активность в ТФ ИФА, специфичность в ТФ ИФА и РЗГА и на уровне 3 пассажа на кроликах вирус был расфасован, лиофилизирован и запаян в ампулы под вакуумом и заложен на хранение при температуре не выше минус 40 °С в качестве Master seed (M.s.) с титром инфекционной активности не ниже 5,0 ЛД₅₀/см³. Полученному штамму вируса геморрагической болезни кроликов присвоено авторское название «КБ-биотех».

Пример 2

Для получения вируса, используемого при изготовлении тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины против ВГБК из штамма «КБ-биотех», использовали полученную и охарактеризованную матровую раскладку Master seed (M.s.) вируса геморрагической болезни кроликов из вышеуказанного штамма. Изначально готовили разведение вируса на физиологическом растворе таким образом, чтобы в конечном разведении содержалось 100 ЛД₅₀/см³. Указанное разведение вируса вводили внутримышечно кроликам в объеме 1,0 см³. Инфицированных кроликов содержали в оборудованном инфекционном виварии в индивидуальных металлических клетках.

Из полученной от павших кроликов печени готовили 10 %-ную вирусную суспензию на забуференном физрастворе (рН 7,2-7,6). В суспензию вносили 5 % хлороформа по объему и эмульгировали при помощи размельчителя ткани (РТ-1) при 4000 об/мин. в течение 5 мин. Суспензию помещали в холодильник при 4 °С на 20-24 часов затем центрифугировали при 3000 об/мин 30 минут.

Инактивацию вируса проводили с помощью 4 %-ного раствора формалина. Раствор формалина готовили в стеклянных бутылках в день составления сырья для вакцины и вносили в вирусную суспензию до конечной концентрации 0,1-0,12 % формальдегида.

Инактивировали вирус при температуре 27-28 °С в течение 3-х суток с периодическим перемешиванием (каждые 2 часа в течение 5 мин).

Началом инактивации считали время после доведения температуры в емкости до 27-28 °С и добавления формалина. После инактивации формалином к суспензии при постоянном перемешивании добавляли метабисульфит натрия (1М раствор) до полной нейтрализации остаточного формальдегида.

Из инактивированного материала брали пробу для проверки стерильности, активности и полноты инактивации. Для проверки полноты инактивации двум кроликам массой 2,5-3,0 кг, не имеющим антител к вирусу геморрагической болезни кроликов, вводили по 3,0 см³ внутримышечно инактивированный материал. Животные в течение 7 суток наблюдения оставались здоровыми.

После окончания инактивации вирусосодержащей суспензии в емкость с вирусной суспензией добавляли гель гидрата окиси алюминия (ГОА) с 3 % сухого остатка после размолла из расчета на 1000 см³ суспензии 200 см³ ГОА (20 %) при рН 7,2-7,4 и температуре 4-8 °С. Сорбцию проводили в течение 1-2 часов с периодическим перемешиванием. Вакцину хранили при 8 °С до получения результатов контроля препарата. Смесь перед фасовкой перемешивали при температуре 8-10 °С в течение 1 часа.

Содержание антигена в дозе вакцины на уровне 640-1280 ГАЕ является его оптимальным количеством в препарате, обеспечивающим достижение технического результата.

Пример 3

С целью определения биологической, антигенной и иммунологической активности вируса геморрагической болезни кроликов штамма «КБ-биотех» вакцинировали клинически здоровых кроликов из благополучных по инфекционным и инвазионным болезням хозяйств, живой массой не менее 2,5 кг.

Для вакцинации кроликов использовали тканевую инактивированную вакцину, изготовленную из штамма вируса геморрагической болезни кроликов, штамм «КБ-биотех», в дозе 0,5 мл внутримышечно. Через 3, 5, 7, 9 дней после иммунизации от иммунизированных животных получали сыворотку крови. Специфическую сыворотку проверяли на активность и специфичность в реакции задержки гемагглютинации. Уровень накопления антител, задерживающих гемагглютинацию при иммунизации кроликов инактивированным вирусом ВГБК штамм «КБ-биотех» приведены в таблице 1.

При изучении иммуногенной активности тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины против ВГБК из штамма «КБ-биотех» установлено, что у кроликов, привитых внутримышечно в дозе 0,5 мл, уже на 5 день после введения препарата индуцируется иммунный ответ, обеспечивающий 90-100 % образование гуморальных антител и защиту от заболевания.

Приведенные в таблице 1 данные характеризуют высокую биологическую, антигенную и иммуногенную активность штамма «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов при введении в организм лабораторным животным.

Полученную вакцину проверяли на внешний вид, стерильность, уровень pH, полноту инактивации вируса, иммуногенность и безвредность.

Стерильность вакцины определяли в соответствии с ГОСТ 28085-89.

Для определения безвредности препарата содержимое пяти флаконов (ампул) с вакциной объединяли, перемешивали и вводили трем кроликам внутримышечно по 3 см³. За животными наблюдали в течение 10 суток. Вакцина считается безвредной, если она не вызывает гибель или заболевания кроликов, а также изменений некротического характера на месте введения в течение срока наблюдения.

Полноту инактивации вируса в вакцине проверяли на четырех кроликах, которым вводили внутримышечно в область средней трети бедра по 3,0 см³. Вакцину считают не содержащей инфекционного вируса, если она не вызывает гибели кроликов от вирусной геморрагической болезни в течение 10 суток после введения препарата.

Антигенную активность вакцины определяли в реакции гемагглютинации (РГА). Для постановки РГА готовили двукратные разведения вакцины от 1:2 до 1:8192. С этой целью во все лунки планшета одного ряда разливали 0,9 % раствор натрия хлорида по 0,05 см³. В первую лунку планшета вносили объем вакцины, равный 0,05 см³, трехкратно пипетировали и перенесли 0,05 см³ во вторую лунку и т. д. Из последней лунки удаляли 0,05 см³ вакцины и перенесли в емкость, содержащую дезинфектант. После разведения вакцины во все лунки внесли по 0,05 см³ 1 %-ной суспензии эритроцитов человека. Планшет встряхивали и оставляли при комнатной температуре 18 °С - 20 °С. Учет реакции проводили через 60-90 мин. Контролем эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию служат две лунки с эритроцитами и 0,9 %-ным раствором натрия (в равных объемах). РГА оценивали положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного «зонтика», а отрицательно - в виде «пуговки». За титр вируса принимают его наибольшее разведение, дающее четко выраженную агглютинацию - в виде «зонтика». Гемагглютинирующий титр в вакцине должен быть не ниже 8,0 log₂, что соответствует разведению 1:256 ГАЕ.

Гемагглютинирующая активность тканевой инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о том, что тканевая инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против ВГБК из штамма «КБ-биотех» обладает высокой гемагглютинирующей активностью.

Иммуногенность вакцины изучали на 13 кроликах, из которых 5 являлись контрольными. Из средней пробы вакцины отбирали 10 см³, из которых 5,0 см³ оставляли в нативном виде, а другие 5,0 см³ разводили в 10 раз 0,9 %-ным раствором натрия хлорида изотонического. Неразведенной (нативной) и разведенной в 10 раз вакциной вакцинировали по четыре кролика внутримышечно в область внутренней стороны бедра по 0,5 см³. Контрольную группу из пяти кроликов оставляли невакцинированными и содержали отдельно. Через 7 суток после иммунизации всех вакцинированных (восемь голов) и контрольных (пять голов) кроликов заражали внутримышечно в область бедра по 1,0 см³ вирулентным вирусом геморрагической болезни кроликов в дозе 1000 ЛД₅₀. За животными вели наблюдение в течение 10 суток.

Все кролики, вакцинированные неразведенной и разведенной 1:10 вакциной оставались живыми (100 %-ная защита). В контрольной группе заболели все пять голов кроликов.

Иммуногенная активность тканевой инактивированной гидроокисьюалюминиевой вакцины против ВГБК из штамма «КБ-биотех», представленные в таблице 3, подтверждают высокую эффективность инактивированной вакцины против ВГБК из штамма «КБ-биотех».

Вакцина против геморрагической болезни кроликов по физико-химическим и иммунобиологическим свойствам соответствует требованиям и нормам, указанным в таблице 4.

Таким образом, приведенная выше информация свидетельствует о выполнении при использовании предлагаемого изобретения следующей совокупности условий: - штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов, воплощающий предлагаемое изобретение, предназначен для использования в сельском хозяйстве, а именно в ветеринарной вирусологии и биотехнологии; - штамм «КБ-биотех», полученный в соответствии с предлагаемым изобретением, обладает высокой инфекционной, антигенной и иммуногенной активностью и пригоден для изготовления вакцинных препаратов против ВГБК.

Таблица 1

№ кроликов	До вакцинации	Титр антител, задерживающих гемагглютинацию			
		После вакцинации (log ₂)			
		3 день	5 день	7 день	9 день
1	0	2	5	7	8
2	0	2	5	6	8
3	0	1	4	6	7
4	0	2	4	7	8

Таблица 2

№ п/п	Серия вакцины	Гемагглютинирующая активность (ГАЕ)
1	Экспериментальная серия № 1 от 28.04.2016	1:4096
2	Производственная серия № 2 от 16.06.2016	1:4096

Таблица 3

Разведения вакцины	Колич-во вакцинированных кроликов	Колич-во зараженных кроликов	Результаты контрольного заражения
Нативные	4	4	4
1:10	4	4	4
Контроль	-	5	0

Таблица 4

Наименование показателя	Характеристика и норма	Результаты испытаний
Внешний вид и цвет	Суспензия серо-коричневого или светло-розового цвета с рыхлым осадком, образующимся на дне флакона при хранении, который легко разбивается при взбалтывании в гомогенную взвесь	Соответствует
Наличие посторонней примеси, изменение цвета, нарушение целостности ампул (флаконов)	Не допускается	Отсутствует
Водородный показатель, ед. pH	7,2-7,8	Соответствует
Стерильность	Должны быть стерильными	Стерильна
Антигенная активность, титр log ₂ , не менее	8,0	10,0
Безвредность в тест-дозе 3,0 см ³	Должны быть безвредными	Безвредна
Иммуногенная активность	Должны быть иммуногенными	Иммуногенна

Формула изобретения

Штамм вируса геморрагической болезни кроликов "КБ-биотех" семейства *Caliciviridae*, род *Lagovirus*, регистрационное наименование "КБ-биотех" вируса геморрагической болезни кроликов, для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

Выпущено отделом подготовки материалов

Государственная служба интеллектуальной собственности и инноваций при Правительстве Кыргызской Республики,
720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03