



(19) KG (11) 2161 (13) C1  
(51) A61K 39/00 (2019.01)

## ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ И ИНОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

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

(21) 20180061.1

(22) 27.06.2018

(46) 31.07.2019, Бюл. № 7

(76) Султаналиев Н. К.; Бейшенова К. Б.; Жунушов А. Т.; Рыскулов А. К.; Карыбек уулу С.; Асанакунова Г. К. (KG)

(56) Патент RU № 2229895 C1, кл. A61K 39/125, 2004

#### (54) Способ изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов

(57) Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в частности, к способу изготовления культуральной вакцины против геморрагической болезни кроликов, и может быть использовано на предприятиях биологической промышленности.

Задачей изобретения является разработка способа изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов, обеспечивающего упрощение технологии изготовления вакцины, сокращение затрат, повышение иммуногенности вакцины.

Поставленная задача решается в способе изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов, включающем культивирование вируса, сбор вирусодержащего материала, определение его инфекционной активности, инактивацию, введение адьювантов, где культивирование вируса производят на первичной культуре клеток почки крольчонка, при этом используют штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов, выделенный из местного эпизоотического очага.

1 н. п. ф., 3 пр., 3 табл.

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в частности, к способу изготовления культуральной вакцины против геморрагической болезни кроликов, и может быть использовано на предприятиях биологической промышленности.

Известна вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов, применяемая в нашей стране (патенты RU № 2039570 C1, кл. A61K 39/125, 1995). Вакцину изготавливают в лиофилизированном виде из 20-25 % инактивированной супензии печени кроликов на забуференном растворе, павших после заражения штаммом вируса геморрагической болезни кроликов. Перед применением вакцину надо растворять специальным растворителем или физраствором.

Наиболее близким аналогом является способ получения вакцины против геморрагической болезни кроликов (Патент RU № 2229895 C1, кл. A61K 39/125, 2004), где для получения вирусного сырья не привитых против вирусной геморрагической болезни кроликов заражают штаммом вируса вирусной геморрагической болезни кроликов и через 48-72 часа после гибели кроликов получают и смешивают 15 % супензию печени на физиологическом растворе (рН 7,2), проводят трехкратное экстрагирование вируса из 10-15 % супензии печени павших кроликов при температуре 4-6 °C в течение 10-12 часов при периодическом перемешивании и освобождении от клеточного детрита фильтрованием через два слоя марли. Проведение инактивации теотропином 0,1 %-ной конечной концентрации при температуре 37 °C в течение 48 часов позволяет подавить патогенность вируса и сохранить высокую иммуногенность в течение 24 месяцев хранения.

Недостатком известных способов является то, что обязательной стадией технологического процесса является размножение вируса в живом организме кроликов. Из-за значительной инфи-

цированности возбудителем существует постоянная угроза его распространения инфекции среди здорового поголовья кроликов.

Задачей изобретения является разработка способа изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов, обеспечивающего упрощение технологии изготовления вакцины, сокращение затрат, повышение иммуногенности вакцины.

Поставленная задача решается в способе изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов, включающем культивирование вируса, сбор вируссодержащего материала, определение его инфекционной активности, инактивацию, введение адьювантов, где культивирование вируса производят на первичной культуре клеток почки крольчонка, и используют штамм «КБ-биотех» вируса геморрагической болезни кроликов.

Способ осуществляют следующим образом.

Первичную культуру клеток почек новорожденных крольчат для репродукции вирусов получают эвтаназией крольчат путем обезглавливания, удаления лапок, хвостов, снятия шкурок, вскрытия брюшной полости на уровне поясничных позвонков, извлечения почек, снятия капсулы органа, измельчения на кусочки величиной 1-3 мм, отмывают от остатков крови солевым раствором Хенкса, подвергают дезагрегации в 0,25 %-ном растворе трипсина путем предварительной инкубации кусочков при 37 °C в течение 30-40 минут, клетки осаждают центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 10 минут, супернатант сливают, а осадок ресусцидируют в ростовой среде, состоящей из среды Игла МЕМ, 0,5 %-ного раствора лактальбумина (1:1) с pH 7,0-7,2 с 10 % сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота или плодов коров, доводят концентрацию клеток до  $5\cdot7\cdot10^5$  клеток/см<sup>3</sup>, затем добавляют антибиотик ципрофлоксацин по 100 Ед/мл. Определяют чувствительность первично-трипсинизированной культуры клеток почек новорожденных крольчат к вирусу геморрагической болезни путем установления титров вирусов в Ig ТЦД 50/мл.

Для приготовления вакцины против геморрагической болезни кроликов клетки первичной культуры (ПК) культивируют в матрацах емкостью 1,5 дм<sup>3</sup> в 0,15 дм<sup>3</sup> поддерживающей среды (0,1 % гидролизат лактальбумина на солевом растворе Хенкса с содержанием пенициллина - 100 ЕД/см<sup>3</sup>, стрептомицина - 100 мкг/см<sup>3</sup>) с 5%-ной фетальной сыворотки при 33 °C в течение 36-48 часов.

Затем, в асептических условиях из матрасов удаляют культуральную жидкость и в монослой ПК вносят 3-6 см<sup>3</sup> посевного материала. В качестве посевного материала используют матриксный штамм «КБ Биотех» с активностью не ниже 6,5 Ig ИД 50/см<sup>3</sup>, полученный 2-3 кратным пассированием тканевого вируса штамма «КБ Биотех» в монослое культуры клеток ПК. Адсорбцию вируса проводят при температуре 33 °C в течение 1,5 часов, после чего добавляют 0,15 дм<sup>3</sup> поддерживающей среды с pH 7,2 и инкубируют зараженную культуру при температуре 33 °C в течение 48-72 часов до полного развития цитопатогенного действия вируса. Вируссодержащий материал сливают и замораживают при минус 40-70 °C. По завершении процесса проводят контроль производственной партии вируссодержащего материала на контаминацию бактериями, грибами, микоплазмами и инфекционную активность вируса на кроликах или в культуре клеток ПК. Инфекционная активность вируса составляла 6,5±0,5 Ig ИД 50/см<sup>3</sup> при титровании на кроликах и 7,0=1=0,5 Ig ТЦД 50/см<sup>3</sup> при титровании в культуре клеток ПК.

Вируссодержащий материал после оттаивания отделяют от клеточного субстрата методом сепарирования при 3000xg при 4-8 °C. Проведение инактивации теотропином 0,1 % конечной концентрации при температуре 37 °C в течение 48 ч позволяет подавить патогенность вируса и сохранить высокую иммуногенность в течение 24 месяцев хранения. Использование 1-2 % алюмокалиевых квасцов позволяет в течение трех суток после введения вакцины обеспечить у привитых кроликов формирование напряженного иммунитета, продолжительностью 12 месяцев. После однократного введения вакцины кроликам внутримышечно или подкожно в дозе 0,5 мл, у животных не возникает поствакцинальных осложнений.

Для определения безвредности препарата содержимое пяти флаконов с вакциной объединили, перемешивали и вводили трем кроликам внутримышечно по 3 см<sup>3</sup>. 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.

Иммуногенность вакцины изучали на 13 кроликах, из которых 5 являлись контрольными. Из средней пробы вакцины отбирали 10 см<sup>3</sup>, из которых 5,0 см<sup>3</sup> оставляли в нативном виде, а другие 5,0 см<sup>3</sup> разводили в 10 раз 0,9 % раствором натрия хлорида изотонического. Неразведенной (нативной) и разведенной в 10 раз вакциной вакцинировали по четыре кролика внут-

римышечно в область внутренней стороны бедра по 0,5 см<sup>3</sup>. 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 см<sup>3</sup> вирулентным вирусом геморрагической болезни кроликов в дозе 1000 ЛД 50. За животными вели наблюдение в течение 10 суток.

Изготовленная по данному способу вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов сохраняет свои иммунобиологические свойства при температуре 4-8 °C не менее 24 месяцев, и позволяет обеспечить защиту животных после однократной прививки до 12 месяцев.

Способ прост в исполнении, доступен и является промышленно применимым. Значительно снижается себестоимость продукции с одновременным повышением чувствительности культур клеток к вирусу геморрагической болезни кроликов и выходу вирусной биомассы.

Преимуществом способа получения первичной культуры клеток почек новорожденных кроликов для репродукции вирусов является то, что используют унифицированную технологию ее получения, позволяющую не только значительно уменьшить возраст используемых доноров первичной культуры клеток до 1-2 дней жизни, тем самым снизить себестоимость продукции, улучшить биологическую активность культивируемых клеток и повысить выход вирусного материала, используемого для производства вакцины против геморрагической болезни кроликов.

Пример 1. Зависимость степени и времени образования монослоя первичной культуры клеток почек кроликов от возраста доноров.

Для изучения степени и времени образования монослоя клеток почек новорожденных крольчат были использованы первичные культуры клеток на 1, 2, 3, 20, 25 и 30 дни после рождения крольчат.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Из данных таблицы видно, что при использовании доноров до 3-суточного возраста, первичная культура была получена во всех случаях, в то время как при использовании 20, 25 и 30 суточного возраста она получена только на 14 сутки.

Пример 2. Определение зависимости эффективности культивирования почечных клеток новорожденных крольчат от числа пассажей. Для определения зависимости культивирования клеток от числа пассажей, первичные культуры клеток подвергали до 57-кратному пассированию их на питательных средах с последующим определением времени и степени образования монослоя клеток почек новорожденных крольчат от смены пассажей. Результаты субкультивирования первичной культуры клеток почек кроликов полученных доноров разного возраста представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что время, затраченное на образование монослоя при культивировании первичных культур, полученных доноров до 3 суточного возраста, меньше, чем 10, 20 и 30 дневного возраста и степень образовавшегося монослоя значительно выше.

С увеличением возраста кроликов до 30 дней, степень покрытия клетками поверхности стекла за 14 дней составляет лишь 75 %.

Пример 3. Определение чувствительности первичной культуры клеток почек новорожденных крольчат к вирусу геморрагической болезни кроликов.

Для определения чувствительности первичных культур клеток почек новорожденных крольчат к вирусам, ростовые среды с указанными культурами клеток заражали вирусом геморрагической болезни кроликов (таблица 3).

Из данных таблицы видно, что вирус геморрагической болезни кроликов легко культивировался в монослое, его цитопатогенное действие отмечалось на 48-96 ч после заражения и характеризовалось специфическим ЦПД. С каждым последующим пассажем на клеточном монослое титр вируса возрастал и на третьем пассаже соответствовал Ig ТЦД50/мл=6,75±0,1.

Таблица 1

Результаты исследований зависимости степени и времени образования монослоя первичной культуры клеток почек кроликов от возраста доноров

Первичная культура клеток	Возраст доноров (дни)	Получена первичная культура	Степень (%) образования монослоя	Время (дни)
ПК	1	+	97	8
	2	+	97	8

3	+	100	10
20	-	37	6
25	-	75	10
30	+	95	14

Таблица 2

Результаты субкультивирования первичной культуры клеток, почек кроликов полученных доноров разного возраста

Культура клеток	Возраст доноров (дни)	Пассаж	Время (дни) образования монослоя	Степень (%) образования монослоя
ПК	1	42	9	100 %
	3	46	10	100 %
	10	52	14	97 %
	20	54	14	88 %
	30	57	14	75 %

Таблица 3

Чувствительность первичной культуры клеток почек новорожденных крольчат к вирусу геморрагической болезни кроликов

Вирус ГБК	Первичная культура клеток ПК	Наличие ЦПД				Lg ТЦД 50/мл		
		24 ч	48 ч	72 ч	96 ч	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж
		-	+	+	+	1,5	4,0	6,75

### Формула изобретения

Способ изготовления вакцины против вирусной геморрагической болезни кроликов, включающий культивирование вируса, сбор вирусодержащего материала, определение его инфекционной активности, инактивацию, введение адьювантов, отличающийся тем, что культивирование вируса производят на первичной культуре клеток почки крольчонка, при этом используют штамм "КБ-биотех" вируса геморрагической болезни кроликов, выделенный из местного эпизоотического очага.

Выпущено отделом подготовки официальных изданий

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