

(19) **KG** (11) **632** (13) **C1** (46) **28.02.2004**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНСТВО ПО НАУКЕ И
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁷ **A61K 39/02**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20020103.1

(22) 09.09.2002

(46) 28.02.2004, Бюл. №2

(76) Иманов Э.Д., Рустембеков О.С., Нургазиев Р.З., Абдылдаев У.А., Эсенгулов Ш.Э., Иманова Э.Э., Алиев Б.К. (KG)

(56) А.с. №751103, кл. C12N 7/00, 1982

(54) Культуральная вирусвакцина против контагиозного пустулезного дерматита овец и способ профилактики

(57) Изобретение относится к области ветеринарии, в частности, к получению ветеринарно-профилактических препаратов. Задача изобретения - расширение арсенала средств профилактических препаратов, повышение иммуногенности вакцины, стабилизации иммунобиологических свойств, увеличение срока хранения, уменьшение ее себестоимости и повышение защитного эффекта вакцинации. Задача решается тем, что в качестве активного вещества используется первично-трипсинизированная культура клеток кожи плода крольчихи; готовый продукт подвергают лиофильной сушке. В целях профилактики вводят ягнятам путем аппликации на свежескарифицированную поверхность кожи верхней губы. Культуральная вирусвакцина против контагиозного пустулезного дерматита овец, содержащая активное вещество, включает аттенуированный штамм "Л-1" №8 ВГНКИ вируса орфа овец и стабилизатор, причем в качестве активного вещества содержит первично-трипсинизированную культуру клеток кожи плода крольчихи, а в качестве стабилизатора - 3 % раствор желатина и 4 % раствор сахарозы в дистиллированной воде в соотношении 9:1 и подвергается лиофильной сушке. Способ профилактики контагиозного пустулезного дерматита овец включает введение вакцинного препарата на основе штамма "Л-1" №8 ВГНКИ, при этом используют препарат на основе штамма "Л-1" №8 ВГНКИ, выращенный на первичной культуре клеток кожи плода крольчихи; введение осуществляют путем аппликации 0.2-0.3 мл вируса вакцины на свежескарифицированную поверхность кожи верхней губы. 2 н. п. ф-лы, 2 пр.

Изобретение относится к области ветеринарии, в частности, к получению ветеринарно-профилактических препаратов.

Известна вакцина против контагиозного пустулезного дерматита овец, где в качестве субстрата размножения вакцинного штамма вируса применяют первичную культуру клеток почечного эпителия овец (А.с. № 751103, кл. C12N 7/00, 1982). Она имеет низкую прививаемость на восприимчивых животных и не обеспечивает устойчивый иммунитет к экспериментальному заражению эпизоотическим вирусом.

Вирус орфа овец относится к строгим дерматропным агентам и поэтому

размножение вакцинного штамма возбудителя в культуре клеток кожи плода способствует более полному сохранению и проявлению иммунно-биологических свойств. Наиболее полноценной системой для размножения вакцинного штамма и производства вакцины против контагиозного пустулезного дерматита овец является первичная культура клеток кожи плода овцы (Иманов Э.Д., Хандуев Ц.Ц., Файзулина С.И., Шаменова Г.У. Адаптация эпизоотических штаммов вируса контагиозной эктимы в культуре ткани. - Профилактика и меры борьбы с болезнями овец: Тез. докл. -М.: МСХ СССР, 1973). Вирусвакцина, приготовленная в этой клеточной системе, обладает высокой прививаемостью на животных и хорошей иммунозащитной эффективностью.

Для изготовления такой вирусвакцины необходимы 2.5-3-х месячные эмбрионы овец, обычно получаемые как отходы на мясокомбинатах при убое выбракованных овцематок. Однако, эти эмбрионы добываются только в период массового убоя (осенью) и то в очень малом количестве, явно не обеспечивающем крупномасштабное производство этого препарата. Вследствие того, что на убой поступают только выбракованные суягные овцематки, получаемые от них эмбрионы часто оказываются контаминированными бактериальной микрофлорой, что делает их непригодными для тканевых культур. Заготовка и убой специально подготовленных и осемененных овцематок с целью получения от них плодов связано с большими затратами, которые в конечном счете увеличивают себестоимость вирусвакцины.

Задачей изобретения является увеличение арсенала средств профилактических препаратов, стабилизация иммунобиологических свойств живой аттенуированной вирусвакцины, увеличение срока хранения и уменьшение себестоимости вакцины.

Задача решается следующим образом. Для изготовления живой культуральной кроличьей вирусвакцины аттенуированным и адаптированным к тканевым культурам штаммом возбудителя заражают первичную культуру клеток кожи плода крольчихи и полученную в ней вируссодержащую суспензию используют в качестве вакцины. Вирусвакцина, приготовленная в культуре клеток кожи плода крольчихи, применяется для профилактики контагиозного пустулезного дерматита овец в неблагополучных овцеводческих хозяйствах.

Культуральная вирусвакцина против контагиозного пустулезного дерматита овец, содержащая активное вещество, включает аттенуированный штамм "Л-1" №8 ВГНКИ вируса орфа овец и стабилизатор, причем в качестве активного вещества содержит первично-трипсинизированную культуру клеток кожи плода крольчихи, а в качестве стабилизатора - 3 % раствор желатина и 4 % раствор сахарозы в дистиллированной воде в соотношении 9:1 и подвергается лиофильной сушке.

Способ профилактики контагиозного пустулезного дерматита овец включает введение вакцинного препарата на основе штамма "Л-1" №8 ВГНКИ, при этом используют препарат на основе штамма "Л-1" №8 ВГНКИ, выращенный на первичной культуре клеток кожи плода крольчихи; введение осуществляют путем аппликации 0.2-0.3 мл вируса вакцины на свежескарificированную поверхность кожи верхней губы.

Вакцинный штамм вируса орфа овец хорошо размножается в первичной культуре клеток кожи плода крольчихи и накапливается в высоком титре, достигающем $10^{6.5}$ ТЦД₅₀/мл. При этом он не теряет иммунологические свойства. Получение кроличьих плодов не связано с сезонностью и значительно дешевле, чем эмбрионов овец. К тому же одна крольчиха в среднем дает от 6 до 8 приплодов, а овца - только один, редко два. Выход клеток кожи от одного плода крольчихи такой же, как и с эмбриона овцы. Кроме того, в наших опытах кроличьи плоды во всех случаях были свободны от контаминации микроорганизмов, при надлежащем ветеринарно-санитарном контроле за маточным поголовьем.

Пример 1. Трипсинизацию кожи плода крольчихи производят по общепринятому в практике тканевых культур методу. Выход клеток на 1 г кожи плода крольчихи составляет 60-70 млн, что равно выходу на 1 г кожи плода овцы. Полученную суспензию клеток кожи

разводят ростовой питательной средой до концентрации 600 тыс. клеток/мл и заливают в культуральные матрасы при стационарном культивировании или в соответствующие цилиндрические сосуды при роллерном методе выращивания. Для цитофизиологического изучения монослойной культуры в инкубационную пробирку помещают покровные стекла и производят светооптическое, электронно-микроскопическое (на сканирующем электронном микроскопе) и планиметрическое исследования состояния клеток в различных сроках инкубации общепринятыми методами. Почти сразу после посева начинается прикрепление к субстрату (поверхности стекла) суспендированных клеток, которые имеют округлые формы с четко выраженными ядрами, узким и плотным слоем цитоплазмы, напоминающие лимфоциты крови. Через 4 ч инкубации наблюдается распластывание цитоплазмы отдельных клеток субстрата и образование отростков, тогда как другие остаются в дремлющем состоянии, что свидетельствует о неодинаковом развитии и адаптации дезагрегированных клеток к новым условиям культивирования. По истечении 4-12 ч появляются межклеточные контакты. На 1-2 сутки образуются отдельные клеточные островки. На 3-5 сутки инкубации зона островков значительно расширяется за счет пролиферации и развития клеток, которые сплошным слоем покрывают почти всю свободную поверхность субстрата и образуют клеточный монослой.

В монослое клетки имеют различную форму и величину в зависимости от места положения. Например, клетки, расположенные в плотном слое колонии, имеют меньшие размеры, чем отдельно лежащие в субстрате. Ядра плотно закрашиваются и имеют различные количества ядрышек в зависимости от стадии развития. В монослойной культуре клеток ткани кожи эмбриона кролика могут пролиферироваться от отдельных рассеянных экземпляров до образования сплошного слоя, который развивается путем увеличения планиметрических размеров клетки, ядер и содержания нуклеиновых кислот, а также других компонентов клеток, что было установлено цитометрическим анализом.

Таким образом, на 3-4 сутки инкубирования при $36 \pm 0.5^\circ\text{C}$ в культуральных сосудах образуется полный монослой клеток, пригодный к заражению вакцинным штаммом вируса орфа овец.

Пример 2. Заражение первичной культуры клеток кожи плода крольчихи производят внесением по 10 мл вирусосодержащей суспензии с титром не ниже $10^{6.0}$ ТЭД₅₀/мл в каждый культуральный матрас (емкостью 1500 мл), после контактирования вируса с клетками в течение 1 ч в культуральные матрасы вносят поддерживающую среду, в соотношении 1:8 к объему сосуда, и инкубируют при 36°C . Контроль за репродукцией вируса осуществляют ежедневными микроскопическими исследованиями зараженной культуры по проявлению характерного цитопатического эффекта.

Светомикроскопическое исследование монослойной культуры клетки кожи эмбриона кролика показало, что первые 4 ч заражения вирусвакциной не вызывает заметных изменений в ее микроструктурной организации.

На сканограмме культуры клеток через 3 суток после заражения с правой стороны клетки в зоне нарушенного межклеточного контакта видны головки везикулярной структуры, а с левой стороны обнаруживаются свободные (внеклеточные) везикулы. Возможно, выход из клетки вирусосодержащего материала происходит в виде везикулы, окутанной мембранным материалом клетки. В результате нарушения контактов между клетками и субстратом клетки округляются, затем отторгаются. На месте сплошного монослоя образуются бесклеточные пустоты. Таким образом, происходит гибель зараженных клеток, обогащая инкубационную жидкость вирусосодержащим материалом. При поражении 85-90 % клеток, которое обнаруживается обычно через 5 дней после инфицирования, вирусосодержащую культуральную жидкость сливают в стерильные бутылки, составляют серию препаратов, проверяют на стерильность, безвредность и иммуногенность согласно требованиям, предусмотренным инструкцией по изготовлению и контролю культуральной вирусвакцины против контагиозного пустулезного дерматита

овец из штамма "Л", утвержденной Главным управлением ветеринарии МСХ СССР. Штамм "Л-1" депонирован под №8 в ВГНКИ ветпрепаратов.

С целью увеличения срока хранения предложена технология производства лиофильно высушенной культуральной вирус-вакцины против контагиозного пустулезного дерматита овец, изготавливаемой на культуре клеток кожи плода кролика.

Технологический режим сушки следующий. В стерильных условиях вакцина разливается по 50 доз во флаконы (1 доза -0.3 мл). С целью ускорения процесса сушки и увеличения поверхности испарения вакцина во флаконах при -45°C проходит закалку в течение 12 часов (практически закалка длится ночь). Сушку проводили в лиофильно-высушенной установке ТГ-50 в течение 7.5 часов при температуре корзины +30°C. Предварительно в жидкую вакцину добавляется в качестве стабилизатора вируса 4 %-й раствор сахарозы и 3 %-й раствор желатина.

По окончании сушки флаконы закупоривают резиновыми пробками и для большей герметизации заливают мастикой. Остаточная влажность в высушенном продукте должна составлять 2-4 %. При таком режиме высушивания титр вируса остается без изменений. Леофильно высушенная вакцина удобна для применения, т. к. может храниться в течение 18 месяцев, в отличие от жидкой, которая ограничена 4 месяцами хранения при 10°C. Перед использованием вакцину следует разводить кипяченой и охлажденной водой до исходного уровня.

Культуральная кроличья вакцина против контагиозного пустулезного дерматита свободна от бактериальной микрофлоры, безвредна для новорожденных ягнят, белых мышей и кроликов при различных путях инфицирования. Безвредность препарата позволяет вакцинировать ягнят с первого дня их рождения. При аппликации 0.2-0.3 мл вирусвакцины на свежескарificированную поверхность кожи верхней губы обеспечивает устойчивый иммунитет к спонтанному и экспериментальному заражению высоковирулентным эпизоотическим вирусом орфа. Прививаемость препарата в пределах 80-90 % при умеренной реактогенности.

Формула изобретения

1. Культуральная вирусвакцина против контагиозного пустулезного дерматита овец, содержащая активное вещество, включающая аттенуированный штамм "Л-1" №8 ВГНКИ вируса орфа овец и стабилизатор, отличающаяся тем, что в качестве активного вещества содержит первично-трипсинизированную культуру клеток кожи плода крольчихи, а в качестве стабилизатора - 3 % раствор желатина и 4 % раствор сахарозы в дистиллированной воде в соотношении 9:1 и подвергается лиофильной сушке.

2. Способ профилактики контагиозного пустулезного дерматита овец, включающий введение вакцинного препарата на основе штамма "Л-1" № 8 ВГНКИ, отличающийся тем, что используют препарат на основе штамма "Л- 1" № 8 ВГНКИ, выращенного на первичной культуре клеток кожи плода крольчихи, введение осуществляют путем аппликации 0.2-0.3 мл вируса вакцины на свежескарificированную поверхность кожи верхней губы.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Бакаева С.К.
Арипов С.К.