



ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (19) **KG** (11) **688** (13) **C1** (46) **30.09.2004**  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ  
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)  
(51)<sup>7</sup> **A61K 39/135; C12N 7/00**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

---

---

(21) 20030027.1

(22) 04.02.2003

(46) 30.09.2004, Бюл.№ 9

(76) Белеков Т.Б., Жунушов А.Т., Жапаралиев Т.О., Султаналиев Н.К., Искенбаева Г.А.

(KG)

(56) RU C1 №2204599, кл. C12N 7/00; A61K 39/135, 2003

(54) **Штамм вируса ящура "Белек-2001" для изготовления диагностических и вакцинных препаратов**

(57) Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии и может быть использовано при изготовлении средств специфической профилактики и диагностики ящура сельскохозяйственных животных типа О. Задачей изобретения является получение штамма, вируса ящура, обладающего высокой биологической, анти- и иммуногенной активностью и обеспечивающего изготовление диагностических и вакцинных препаратов. Задача решается получением штамма вируса ящура «Белек 2001», семейство Picornaviridae, род Aphtovirus, серотип О, для изготовления диагностических и вакцинных препаратов. 9 пр., 7 табл., 2 ил.

Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии и может быть использовано при изготовлении средств специфической профилактики и диагностики ящура.

Вирус ящура относится к роду афтovирусов, семейству пикорнавирусов. Он включает 7 иммунологических типов и множество подтипов.

Особенностью возбудителя ящура является антигенная изменчивость штаммов в пределах одного серотипа, зависящая от территории, видового породного состава восприимчивого животного, иммунного статуса и множества других факторов.

Наиболее близким к предполагаемому изобретению является штамм вируса ящура типа О, 1734 «Приморский-2000», который депонирован в Коллекции микроорганизмов ВГНКИ 22.03.2000 г. под регистрационным номером 1734 «Приморский-2000-ДЕП» (RU C1 №2204599, кл. C12N 7/00; A61K 39/135, 20.05.2003).

Недостатки данного штамма состоят в его низкой биологической, анти- и

иммуногенной активности.

Задачей изобретения является получение штамма вируса ящура, обладающего высокой биологической, анти- и иммуногенной активностью и обеспечивающего изготовление диагностических и вакцинальных препаратов.

Исходный вирус для получения штамма «Белек-2001» выделен от больного крупного рогатого скота в хозяйстве ОКХ «Ветка» Сокулукского района. Производственный штамм «Белек-2001» получен путем многократных исследовательских пассажей на 1-2-дневных крольчатах и мышатах-сосунах.

Полученный штамм паспортизирован и депонирован под регистрационным номером 09.04/138, Республика Казахстан, Жамбылская обл., Кордайский район, пгт Гвардейский, НИСХИ.

Штамм вируса ящура «Белек-2001» характеризуется следующими признаками и свойствами:

Морфологические свойства. Штамм «Белек-2001» относится к семейству Picornaviridae, роду Aphtovirus, серотипу О и обладает морфологическими признаками, характерными для возбудителя ящура: форма вириона икасаэдрическая, размер 22-26 им. Вирион состоит из молекул РНК, заключенных в белковую оболочку. Белковая оболочка состоит из 32 капсомеров, расположенных в кубической симметрии.

Антигенные свойства. По своим антигенным свойствам штамм относится к серотипу О. Вирус стабильно нейтрализуется гомологичной антисывороткой. У переболевших и вакцинированных животных (КРС, МРС, свиньи, яки) в сыворотке крови образуются антитела, выявленные в РДП (реакция диффузионной преципитации), РРИД (реакция радиальной иммунодиффузии), РСК (реакция связывания комплемента), РН (реакция нейтрализации). При гипериммунизации морских свинок концентрированным инактивированным вирусом индуцирует образование специфических антител, выявляемых в РРИД в разведении 1:16-1:32.

Экспериментально подтверждена возможность его использования для изготовления диагностических препаратов и инактивированных вакцин.

Биологическая характеристика. Представленные анализы свидетельствуют о том, что в отличие от штамма «Приморский» штамм «Белек-2001» проявляет более высокую биологическую, анти- и иммуногенную активность как в нативном виде, так и после инактивации.

Штамм предназначен в качестве сырья для изготовления диагностических и вакцинальных препаратов. Штамм репродуцируется в культурах клеток и в организме 1-2-дневных крольчат. В течение 20-30 часов инкубирования накапливается до 7.5 Ig<sub>2</sub> и 10.5 ЛД<sub>50/мл</sub> в течение 10 пассажей.

Физические свойства. Устойчив к внешним факторам. Штамм вируса «Белек-2001» устойчив к эфиру, хлороформу и другим органическим растворителям. Наиболее стабилен при pH 7.2-7.4. Чувствителен к формальдегиду, УФ-облучению, γ-облучению и высоким температурам.

Дополнительные признаки и свойства.

Иммуногенная активность - иммуногенен в составе инактивированной вакцины.

Реактогенность - реактогенными свойствами не обладает.

Патогенность - патогенен для парнокопытных и лабораторных (морских свинок, кроликов, мышей и т. п.) животных.

Вирулентность - вирулентен для естественно-восприимчивых животных при контактном заражении.

Результаты адаптации вируса к 1-2-дневным крольчатам, мышатам, морским свинкам представлены в таблице 1. Данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о высокой активности штамма «Белек-2001» к организму 1-2-дневных крольчат (7.5 Ig<sub>2</sub> и 10.5 ЛД<sub>50/мл</sub>).

При оценке эффективности и специфичности приготовленных серий

диагностикумов положительные результаты получены только с пробами сывороток гомологичного типа О, а с гетерологичными сыворотками и сыворотками нормальных животных, а также специфическими сыворотками оспы овец получены отрицательные результаты (табл. 2, 3).

Приготовленные концентрированные антигены являются специфичными и активными и могут использоваться для конструирования вакцинных и диагностических препаратов.

Для изготовления вакцинных и диагностических препаратов использовали 1-2-дневных крольчат. Крольчат заражали подкожно по 1 мл 10 %-ной суспензией 5-го пассажа лапинизированного вируса. Тушки павших крольчат измельчали в размельчителе РТ-1 с фосфатным буферным раствором в соотношении 1:10.

Очистку вирусодержащей суспензии проводили хлороформом (5 %) и комбинированным методом в сочетании ПЭПА (полиэтиленполиамин) 0.05 - 0.1 % + хлороформ -5 %. Вирус, очищенный комбинированным методом, инактивировали 0.15 % ДЭИ (димерэтиленимин) при температуре 58°C в течение 1 часа или формальдегидом 0.04 %-ной концентрации в течение 48 часов.

Авирулентность антигена определяли на мышатах-сосунах, которых заражали в дозе 0.1 мл подкожно в область спины. Учет результатов проводили ежедневно в течение 7 суток.

После очистки, инактивации вирусодержащую суспензию концентрировали ПЭГ (полиэтиленгликоль) 10 %.

Специфическую преципитирующую сыворотку получали от гипериммунизированных яков через 30-60 дней после двухкратной вакцинации.

### **Пример 1.**

Крольчат, мышат и морских свинок заражали подкожно 20 % суспензией в дозе  $10^{5.0}$ - $10^{7.0}$  ЛД<sub>50</sub>. После заражения крольчат помещали в термальную комнату с температурой 28-30°C, а мышат, морских свинок содержали при 24-28°C. Отбор животных проводили по мере наступления атонального состояния. Было проведено 10 последовательных пассажей на крольчатах, по 5 пассажей - на мышатах и морских свинках.

Активность вируса 10-го пассажа, адаптированного на крольчатах составила 10.5 ЛД<sub>50</sub>, а на мышатах - 8.5 ЛД<sub>50</sub>, на морских свинках - 6.5 ЛД<sub>50</sub> (5-й пассаж).

### **Пример 2.**

Для очистки лапинизированного вируса ящура использовали комбинированный метод: хлороформ и ПЭПА в различных концентрациях.

Приведенные в таблице 4 данные показывают, что очистка вирусодержащей суспензии, приготовленной на аммиачном буферном растворе с помощью ПЭПА и хлороформа обеспечивает существенное повышение степени освобождения от балластных белков. Очищенная этим методом вирусодержащая суспензия была прозрачная и содержала от 60 до 71 мг % белка, в то время, как в суспензии, очищенной хлороформом, содержалось 126 мг %.

В процессе очистки вирусодержащей суспензии от балластных белков указанными методами очищение происходило без снижения потери вируса и комплементсвязывающего антигена (Т: 16).

### **Пример 3.**

В опытах по инактивации вируса ящура типа О с биологической активностью  $10^{10.5}$  ЛД<sub>50</sub> использовали формальдегид и ДЭИ. Инактивацию вируса ящура проводили в суспензии, приготовленной на аммиачном буферном растворе с pH 8.2-8.6 в течение 36 часов при одинаковых условиях для каждого химического реагента. Действие инактивантов нейтрализовали добавлением 20 %-ного тиосульфата натрия (1: 10).

ДЭИ инактивирует вирус ящура за 6-15 часов, а формальдегид - за 24-36.

Авирулентность инактивированной суспензии вируса ящура доказана 3-кратным

перепасированием на крольчатах 1 - 2-дневного возраста. В антигенном отношении оба химических реагента показали одинаковые результаты.

Данная методика инактивации позволяет получить авирулентную супензию вируса ящура без снижения антигенной активности.

**Пример 4.**

Проведенные исследования позволили установить, что с помощью 1.5 % ГОЭ вирус концентрируется только 10 раз, а с помощью ПЭГ с концентрацией 5, 7 и 10 % кратность концентрирования вируса можно достичь до 20 раз.

Следовательно, наиболее оптимальным методом концентрирования вируса ящура является ПЭГ в концентрации 10 %.

**Пример 5.**

Для проверки анти- и иммуногенной активности универсальной противоящурной вакцины использовали 120 голов морских свинок. Для определения минимальной дозы вакцины животных разделили на шесть групп по 20 голов в каждой группе. Вакцину разводили в соотношении 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243. Контрольных животных не вакцинировали. Через 3, 7 суток после вакцинации всех опытных и контрольных животных заражали вирусом ящура гомологичного типа О в дозе  $10^{3.0}$  ЛД<sub>50</sub>. За животными вели наблюдение в течение 14 суток после заражения. Защищенными от ящура считались не заболевшие животные (таблица 5).

Морские свинки, вакцинированные универсальной противоящурной вакциной, противостояли контролльному заражению вирусом ящура. Общее состояние животных в течение всего периода наблюдения было удовлетворительным, клинические признаки ящура не установлены.

Анти- и иммуногенную активность вируса вакцины ящура проверяли на крупном и мелком рогатом скоте и свиньях, ранее не подвергавшихся вакцинации против ящура. Было привито по 2 головы крупного рогатого скота, овец и поросят.

Животным подкожно вводили вакцину в дозе 1 мл крупному рогатому скоту, овцам и поросятам - внутримышечно. Реактогенность вакцины определяли по температурной реакции и по наличию воспалительного отека на месте введения через 1-14 дней.

У привитых животных температурная реакция не наблюдалась, побочных реакций не установлено.

Об антигенной активности вакцины судили по уровню антител в сыворотках крови, которые выявляли с помощью реакции нейтрализации и связывания комплемента (таблица 6).

В сыворотках крови животных противоящурные антитела в РН и РСК до и через 3 дня после вакцинации не обнаруживались. Однако на 7 сутки из 6 голов животных (КРС, овцы, свиньи) вируснейтрализующие антитела обнаруживались у всех животных в титрах от 1.75 до 2.75 лог<sub>2</sub>, комплементсвязывающие антитела - от 0.4 до 1.5 лог<sub>2</sub>.

Через 21 день титры антител в среднем составляли от 5.5 до 7.0 лог<sub>2</sub> по РН и 3.0-6.0 лог<sub>2</sub> по РСК. На 30-60 дни титры антител у всех видов животных были примерно одинаковы. В РН они составили от 5.0 до 8.25 лог<sub>2</sub>, в РСК - от 5.0 до 7.75 лог<sub>2</sub>.

На основании данных серологических реакций (РН, РСК) можно судить, что противоящурная вакцина штамма «БЕЛЕК-2001» является высокоантигенной, так как при однократной иммунизации крупного, мелкого рогатого скота и свиней антитела накапливаются в высоких титрах и остаются на этом уровне более 60 дней (срок наблюдения).

**Пример 6.**

Оценку напряженности иммунитета у крупного рогатого скота, овец и свиней проводили после вакцинации путем контрольного заражения по 2 головы.

Контролем служила 1 голова каждого вида невакцинированных животных.

Опыты проводили в титражнике АО «Алтын-Тамыр». Вирулентный вирус ящура

штамма «БЕЛЕК-2001» вводили интраназально в дозе 10 000 ИД<sub>50/02</sub> мл в 2 точки крупному рогатому скоту, 10 точек - овцам и свиньям. Отсутствие или наличие ящурных афт на месте введения и генерализаций ящурного процесса служили критерием оценки иммунитета. Результаты контрольного заражения животных представлены в таблице 7.

Из данных таблицы видно, что все вакцинированные животные при контрольном заражении противостояли ящурной инфекции. У животных при клиническом осмотре первичных и вторичных афт на месте введения вируса не обнаружено. В то же время контрольные животные заболели ящуром в генерализованной форме с образованием первичных и вторичных афт.

Результаты контрольного заражения показали, что все вакцинированные животные устойчивы к ящиру при экспериментальном заражении в 100 % случаев.

#### **Пример 7.**

Сохраняемость иммуногенных свойств вируса вакцины ящура изучали при хранении в холодильнике как при +4 - +8°C, так и при комнатной температуре +25 - +30°C в течение 6 месяцев (срок наблюдения). Иммуногенную активность в различные сроки проверяли на морских свинках. Результаты проведенных исследований показали, что при хранении при +4 - +8°C через 6 месяцев иммуногенные свойства сохраняются на 100 %, а при комнатной температуре - несколько снижаются (на 1 порядок ИмД<sub>50</sub>).

#### **Пример 8.**

Для получения специфической преципитирующей сыворотки животных иммунизировали двукратно моновалентной традиционной противоящурной вакциной в объеме 2.0 мл. Через 20, 30, 60 дней получали пробы сывороток (рис. 1).

Специфические антитела в сыворотках крови крупного, мелкого рогатого скота и свиней накапливаются в титрах от 1:2 до 1:8, у яков от 1:4 до 1:32, а у свиней - 1:2.

Для получения специфических сывороток для серологических реакций использовали яков, которых иммунизировали концентрированной вирус-вакциной штамма ящура типа О, в дозе 2 мл подкожно и гипериммунизировали через 7 дней после первичной иммунизации в той же дозе (рис. 2).

Яки, иммунизированные универсальной противоящурной вакциной типа О, были высокоактивными на 30-60 дней в РДП - до 1:128, в РРДП - до 1:256 (таблица 2).

Сохраняемость полученных преципитирующих сывороток изучали при различных температурных условиях в течение 12-месяцев хранения при температуре +4 - +6; +20 - +25; -10 - -12°C. Исходную преципитирующую активность сыворотки сохраняют в течение 12-ти месяцев при температуре -10 - -12°C (срок наблюдения), в то время как при температуре +4 - +6°C к 300 дню титры антител снижаются до 1:16, а при температуре +20 - +25°C к 120-150 дню полностью утрачивают преципитирующую активность.

#### **Пример 9.**

Для приготовления специфического преципитирующего антигена тушки крольчат измельчали в размельчителе РТ-1 с фосфатным буферным раствором в соотношении 1:10 с pH 7.2-7.4. Замораживали при температуре -40°C, затем размораживали и центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 30 минут.

Очистку вирусодержащей суспензии проводили с использованием хлороформа (5 %) и полиэтиленполиамина (0.05 %) + хлороформ (5 %) - комбинированный метод.

Преципитирующие антигены инактивировали формальдегидом от 0.02 до 0.1 %. ДЭИ - от 0.1 до 0.4 %-ой концентрации.

Остаточную вирулентность антигена проверяли на мышатах-сосунах 3-4-дневного возраста.

Очищенный, инактивированный антиген концентрировали ПЭГ мм. 115, 6 000 в 5. 7 и 10 %-ной концентрации (табл. 3).

Приведенные в таблице данные показывают, что преципитирующие антигены, концентрированные ПЭГ в 10 раз, титр антигена повышается в 2 раза, при концентрировании в 50 раз титр антигена повышается в 4 раза и при концентрировании в

100 - 16 раз.

Специфичность. Специфические свойства преципитирующих антигенов проверяли с нормальными, заведомо положительными, и гетерологическими сыворотками других инфекций. Кроме того, в опытах использовали диагностические сыворотки других типов вируса ящура - АЗИЯ-1, С, САТ-1, САТ-2, САТ-3.

Преципитирующие антигены реагируют только с гомологичными сыворотками, полученными на соответствующих типах вируса ящура.

Сохраняемость. Активность антигенов изучали при различных температурах и сроках хранения: +4, +6, +20, +25, -10, -12°C в течение 10, 30, 60, 90, 180, 270 и 360 дней. Антигены сохраняют преципитирующую активность при температуре -10, -12°C в течение 360 дней (срок наблюдения). При температуре +4 - +6°C активность сохраняется в течение 180, а при температуре +20 - +25°C полностью теряется активность через 60 днем после хранения.

### **Формула изобретения**

Штамм вируса ящура "Белек-2001", семейство Picornaviridae, род Aphtovirus, серотип О, для изготовления диагностических и вакцинных препаратов

Таблица 1

Накопление вируса ящура О в организме новорожденных крольчат, мышат и морских свинок в процессе пассирования

Наименование вирусодержащего материала	Вид животных	Пассаж											
		1	2	3	4	5	Титр вируса в лог ЛД <sub>50</sub>	6	7	8	9	10	Титр вируса в лог ЛД <sub>50</sub>
Афты	крольчата	10/4	10/7	10/9	10/10	10/10	9.0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10.5
	мышата	10/5	10/6	10/10	10/10	10/10	8.5	-	-	-	-	-	-
	морские спинки	10/2	10/4	10/6	10/7	10/8	6.5	-	-	-	-	-	-
Дефибринированная кровь	крольчата	10/4	10/6	10/8	10/9	10/10	9.0	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10.5
	мышата	10/3	10/6	10/8	10/10	10/10	9.5	-	-	-	-	-	-
	морские свинки	10/2	10/3	10/5	10/7	10/8	6.0	-	-	-	-	-	-
Контроль	крольчата	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	-
	мышата	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	-	-	-	-	-	-
	морские свинки	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	-	-	-	-	-	-

Примечание: числитель - количество зараженных животных;  
 знаменатель - количество заболевших животных.

Таблица 2  
Преципитирующая активность специфических сывороток

№№ сывороток	Титры сывороток в РДП и РРИД			
	Нативные		После обработки теплом	
	РДП	РРИД	РДП	РРИД
25	1:64	1:128	1:64	1:128
47	1:128	1:256	1:128	1:256
60	1:128	1:256	1:128	1:256
71	1:32	1:64	1:32	1:64

Таблица 3  
Активность преципитирующих антигенов

Серии антигенов	Титры антигенов	
	РДП	РРИД
1	1:8	1:8
2	1:16	1:32
3	1:16	1:16
Нормальный антиген	—	—

Таблица 4  
Результаты опытов по очистке вирусодержащей суспензии хлороформом и ПЭПА

Тип вируса	Способ очистки	Содержание белка, мг/%	Инфекционность, ЛД <sub>50</sub>	Результат РСК, титр
O <sub>1</sub>	5 % хлороформ	126	10.5	1:16
	0.05 % ПЭПА+5 % хлороформ	71	10.5	1:16
	0.1 % ПЭПА+5 % хлороформ	67	10.5	1:16
	0.2 % ПЭПА+5 % хлороформ	60	10.5	1:16

Таблица 5  
Результаты определения дозы противоящурной вакцины

Разведение вакцины	Доза вакцины, см <sup>3</sup>	Количество вакцинированных животных	Результаты контрольного заражения
1:3	0.67	20	20
1:9	0.22	20	20
1:27	0.07	20	20
1:81	0.025	20	14
1:243	0.008	20	6
Контроль	—	20	0

Таблица 6

Динамика накопления вируснейтраллизующих и комплементсвязывающих антител у животных, привитых противоящурной вакциной типа О из штамма «БЕЛЕК-2001»

Вид животных	№№ животных	Титры антител в лог <sub>2</sub>										
		До вакцинации	РН					РСК				
			3	7	21	30	60	3	7	21	30	60
Крупный рогатый скот	1	отр.	отр.	2.25	6.2	8.25	8.25	отр.	0.75	4.75	6.0	6.9
	2	отр.	отр.	1.75	5.5	7.75	8.25	отр.	1.5	6.0	7.75	8.0
Овцы	3	отр.	отр.	2.0	5.75	5.0	7.0	отр.	1.0	4.0	7.25	7.5
	4	отр.	отр.	2.25	6.0	6.75	8.0	отр.	1.5	4.75	6.25	6.7
Свиньи	5	отр.	отр.	2.0	7.0	7.75	8.0	отр.	0.4	3.0	5.0	7.0
	6	отр.	отр.	2.75	0.25	8.0	8.25	отр.	0.8	5.0	6.0	8.0

Таблица 7

Результаты контрольного заражения крупного, мелкого рогатого скота и свиней через 14 дней после вакцинации противоящурной вакциной из штамма «БЕЛЕК-2001»

Вид животных	Кол-во животных	Средний титр антител перед контрольным заражением		Результаты контрольного заражения					% защиты
		РН лог <sub>2</sub>	РСК лог <sub>2</sub>	Темпера турная реакция, гол.	Наличие афт, гол.		Заболевание с генерализацией, гол.		
					первичных	вторичных			
Крупный рогатый скот	2	5.8	5.4	-	-	-	-	-	100.0
	контроль	-	-	+	+	+	+	+	0
Овцы	2	5.7	4.4	-	-	-	-	-	100.0
	контроль	-	-	+	+	+	+	+	0
Свиньи	2	6.1	4.0	-	-	-	-	-	100.0
	контроль	-	-	+	+	+	+	+	0

Примечание: + - заболело

животных;

- заболевание не отмечено.

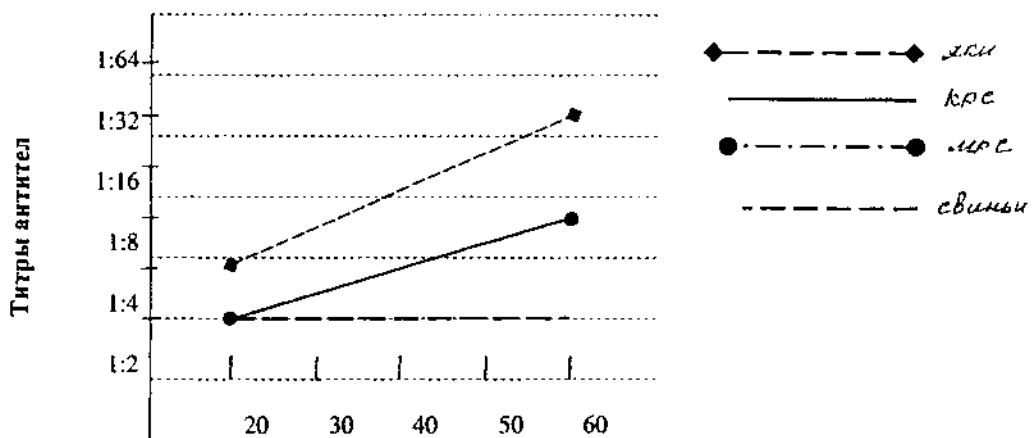


Рис. 1. Титр преципитирующих антител в сыворотках животных, привитых противоящурными вакцинами.

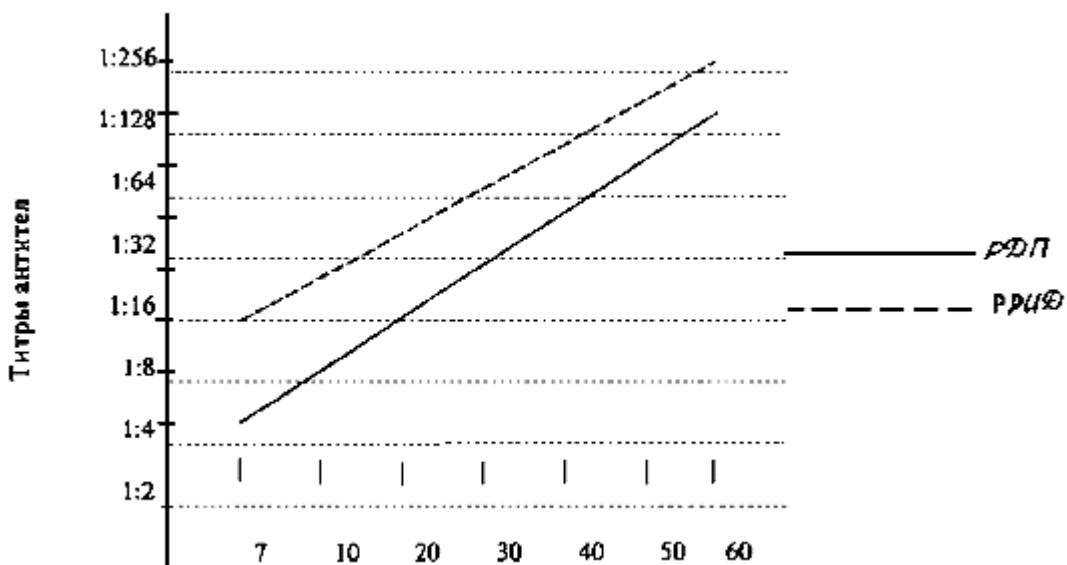


Рис. 2. Титр преципитирующих антител в сыворотках яков, привитых универсальной противоящурной вакциной после гипериммунизации.

Составитель описания  
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.  
Арипов С.К.