

(19) **KG** (11) **899** (13) **C1** (46) **31.10.2006**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51) **A61K 39/02** (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20050017.1

(22) 15.03.2005

(46) 31.10.2006, Бюл. №10

(76) Иманов Э.Д., Адамбеков Д.А., Касымов Т.К., Рустембеков О.С., Троцкий Е.Н., Орозов Ж.Ч., Алиев Б.К., Рыспеков М.Р., Усубалиев А.К. (KG)

(56) Патент RU №2138291, кл. A61K 39/02, 1999

(54) **Способ получения культуральной вакцины против оспы овец**

(57) Изобретение относится к ветеринарной вирусологии, в частности для получения ветеринарно-профилактических препаратов. Задачей изобретения является разработка способа получения безвредной, высокоиммуногенной, стабильной при хранении культуральной вакцины против оспы овец. Поставленная задача решается получением культуральной вакцины против оспы овец, включающей получение вирусосодержащего материала в культуре клеток и его лиофилизацию, где для получения вируса используют культуру клеток кожи плода овец и кролика. 2 пр.

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

Известен способ получения вакцины против оспы овец, где в качестве субстрата размножения вакцинного штамма вируса применяют первичную культуру клеток почечного эпителия овец (RU, C1, №2138291 кл. A61K 39/275; C12N 5/00) 1999

Полученная этим способом вакцина имеет низкую приживаемость на восприимчивых животных и не обеспечивает устойчивый иммунитет к спонтанному и экспериментальному заражению эпизоотическим вирусом.

Задачей изобретения является разработка способа получения безвредной, высокоиммуногенной, стабильной при хранении культуральной вакцины против оспы овец.

Указанная задача решается получением культуральной вакцины из первичной культуры клеток кожи плода овцы и кролика.

Для изготовления живой культуральной вакцины аттенуированным и адаптированным к тканевым культурам штаммом возбудителя заражают первичную культуру клеток кожи плода овцы и кролика и полученную в ней вирусосодержащую суспензию используют в качестве вакцины.

Вирус оспы овец относится к строгим дерматропным агентам и поэтому размножение вакцинного штамма возбудителя в культуре клеток кожи плода овцы и кролика способствует более полному сохранению и проявлению иммунобиологических свойств. Наиболее полноценной системой для размножения вакцинного штамма и производства вакцины против оспы овец является первичная культура клеток кожи плода овцы и кролика. Вакцина, приготовленная в этой кле-

(19) **KG** (11) **899** (13) **C1** (46) **31.10.2006**

точной системе, обладает высокой прививаемостью на животных и хорошей иммунозащитной эффективностью.

Для получения культуральной вакцины используют первичную культуру клеток кожи плода овцы и кролика, выращенную в роллерных сосудах.

Перед заражением среду из 100 роллерных сосудов сливают и в каждую из них вносят по 5 см³ матрасовой раскладки вируса с биологической активностью 5.0 ЛгТЦД_{50/см³} и по 300 см³ поддерживающей питательной среды 199 и ИГЛА с 5% инаktivированной сыворотки КРС.

Выращивание вируса проводят при температуре 38 ± 1°C. Скорость вращения роллерных сосудов составляет 10-13 об/ч. Смену среды проводят через каждые 2 суток. Через 120 часов (5-е сутки культивирования) около 80% монослоя было поражено.

Содержимое роллерных сосудов заморозили при минус 40°C. В опыте было получено 30 дм³ вирусосодержащей жидкости с биологической активностью 5.75 ЛгТЦД_{50/см³}, которую использовали для изготовления вакцины.

Биологическая активность

При титровании биопрепаратов в монослойной пробирочной культуре клеток кожи активность по сериям составила серия №1-5.25 Лг, серия №3-5.25 Лг, серия №5-5.75 ЛгТЦД_{50/см³}.

При введении препарата овцам по 5 см³ (6 голов – по 2 головы на серию) все животные оставались клинически здоровыми в течение 10 суток наблюдения.

Иммуногенная активность

Проверяли иммуногенную активность 2 и 4 серий. Овцы (6 голов), привитые в дозе 1000 ТДЦ_{50/02} мл через 12 суток после вакцинации не реагировали на введение 1000 ИД 50 вирулентного штамма "ЭД" вируса оспы овец. При этом контрольные зараженные (2 головы) заболели оспой с характерными клиническими признаками.

С целью увеличения срока хранения предложена технология производства лиофильно высушенной культуральной вирусвакцины против оспы 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 закладка длится ночь).

Сушку проводили в лиофильно-сушильной 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 большой 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.

Пример 1. Трипсинизацию кожи плода овцы и кролика производят по общепринятому в практике тканевых культур методу. Выход клеток на 1 г кожи плода кролика составляет 60-70 млн, что равно выходу кожи плода овцы. Полученную суспензию клеток кожи разводят ростовой питательной средой до концентрации 600 тыс/мл и заливают в культуральные матрасы при стационарном культивировании или в соответствующие цилиндрические сосуды при роллерном методе выращивания.

Таким образом, на 3-4 сутки инкубирования при 36 + 0.5°C в культуральных сосудах образуется полный монослой клеток, пригодный к заражению вакцинным штаммом вируса оспы овец.

Пример 2. Заражение первичной культуры клеток кожи плода кролика производят внесением по 10 мл вирусосодержащей суспензии с титром не ниже 10^{6.0} ТЦД_{50/02} мл в каждый культуральный матрас (емкость 1500 мл), после контактирования вируса с клетками в течение 1 часа, в культуральные матрасы вносят поддерживающую среду, в соотношении 1:8 к объему сосуда и инкубируют при 36°C. Контроль за репродукцией вируса осуществляют ежедневным микроскопическими исследованиями зараженной культуры, по проявлению характерного цитопатического эффекта.

Культуральная вакцина против оспы свободна от бактериальной микрофлоры, безвредна для новорожденных ягнят, белых мышей и кроликов при различных путях инфицирования. Без-

вредность 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 оспы. Прививаемость препарата в пределах 80-90% при умеренной реактогенности.

Формула изобретения

Способ получения культуральной вакцины против оспы овец, включающей получение вирусосодержащего материала в культуре клеток и его леофилизацию, отличающийся тем, что для получения вируса используют культуру клеток кожи плода овец и кролика.

Составитель описания

Усубакунова З.К.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03