

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ



ӨНЕРТАБЫСҚА
ПАТЕНТ

АСТАНА



(19) **ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ӘДІЛЕТ МИНИСТРЛІГІ**

ӨНЕРТАБЫСҚА

(11) **№ 32147**

(12) **ПАТЕНТ**

(54) **АТАУЫ:** Түйелер қорасандар вирусының аттенуирленген штаммынан түйелер қорасандарға қарсы эмбриондық вирус-вакцинаны дайындау тәсілі

(73) **ПАТЕНТ ИЕЛЕНУШІСІ:** Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің "Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты" шаруашылық жүргізу құқығындағы республикалық мемлекеттік кәсіпорыны (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЛАР):** Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Мамбеталиев Муратбай Абдибаевич (KZ); Табынов Кайрат Казыбаевич (KZ); Килибаев Санат Серикович (KZ); Булатов Ербол Аkenович (KZ); Абсатова Жаркинай Серикбаевна (KZ)

(21) **Өтінім №** 2015/1247.1

(22) **Өтінім берілген күн:** 27.10.2015

16.05.2017 Қазақстан Республикасы Өнертабыстардың мемлекеттік тізілімінде тіркелді.

Патентті күшінде ұстау ақысы уақытылы төленген жағдайда, патенттің күші Қазақстан Республикасының бүкіл аумағында қолданылады.

**Қазақстан Республикасы
Әділет министрінің орынбасары**

Э. Әзімова

Өзгерістер енгізу туралы мәліметтер осы патентке қосымша түрінде жеке парақта келтіріледі

002831



(19)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

(12)

ПАТЕНТ

(11)

№ 32147

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(54) **НАЗВАНИЕ:** Способ приготовления эмбриональной вирусвакцины против оспы верблюдов из аттенуированного штамма вируса оспы верблюдов

(73) **ПАТЕНТООБЛАДАТЕЛЬ:** Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики (KZ)

(72) **АВТОР (АВТОРЫ):** Сансызбай Абылай Рысбайұлы (KZ); Мамбеталиев Муратбай Абдибаевич (KZ); Табынов Кайрат Казыбаевич (KZ); Килибаев Санат Серикович (KZ); Булатов Ербол Акенович (KZ); Абсатова Жаркинай Серикбаевна (KZ)

(21) Заявка № 2015/1247.1

(22) Дата подачи заявки: 27.10.2015

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Республики Казахстан 16.05.2017.

Действие патента распространяется на всю территорию Республики Казахстан при условии своевременной оплаты поддержания патента в силе.

Заместитель министра юстиции
Республики Казахстан

Э. Азимова

Сведения о внесении изменений приводятся на отдельном листе в виде приложения к настоящему патенту



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 32147
(51) C12N 7/00 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2015/1247.1

(22) 27.10.2015

(45) 15.06.2017, бюл. №11

(72) Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Мамбеталиев Муратбай Абдибаевич; Табынов Кайрат Казыбаевич; Килибаев Санат Серикович; Булатов Ербол Аkenovich; Абсатова Жаркинай Серикбаевна

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) Килибаев С.С. Оценка безвредности вакцины против оспы верблюдов на лабораторных животных // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. 2015. Т.15. №1(33). с.31-33

Валиева А.Д., Булатов Е.А., Абдрахманова Б.С., Табынов К.К., Килибаев С.С. Инактивация вируса оспы верблюдов // Наука, новые технологии и инновации. 2014. №4. с.144-145

US 4380582 A, 19.04.1983

US 4374201 A, 15.02.1983

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ВИРУСВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ ИЗ АТТЕНУИРОВАННОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ ВЕРБЛЮДОВ

(57) Предлагаемое изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в частности - к способу получения эмбриональной вакцины против оспы верблюдов.

Предлагаемый способ, предусматривает изготовление безвредной, высокоиммуногенной эмбриональной вирусвакцины, пригодной для профилактики оспы верблюдов.

(19) KZ (13) B (11) 32147

Предлагаемое изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии, в частности - к способу получения эмбриональной вакцины против оспы верблюдов.

Уровень техники

Известен способ получения живых и инактивированных вакцин в Саудовской Аравии и ОАЭ, полученного на основе аттенуированного штамма (Ducarox 298/89) вируса, адаптированного в перевиваемой клеточной линии кожи эмбриона дромеда (Dubca) (Kaaden O.R., Wernery U., Klopries M., 1995). Вакцина в промышленных масштабах производится в Южной Африке, названная Ducarox® = Dubai camelpox vaccine (Wernery U., Kinne J., Zachari- ah R., 2000). Производитель рекомендует вводить бустерную дозу вакцины верблюдам от 6 до 9-месячного возраста, ревакцинация через 4 недели. Метод введения вакцины - подкожно.

Известна живая культуральная вакцина из штамма Joutf-78 производства Саудовской Аравии (Hafez S.M., Al-Sukayran A., Dela Cruz D.M., Mazloun K.S., Al-Bokmy A.M., Al-Mukayel A. & Amjad A.M., 1992).

Известна инактивированная ГОА вакцина из штамма «Т8» производство Марокко (EL-Harrak M., 1998г.).

Живые вакцины обладают рядом преимуществ перед инактивированными, главными из которых являются: высокая напряженность и длительность создаваемого ими иммунитета при небольшой дозе вакцины, слабая кратковременная общая и местная реакция, простота применения (однократная вакцинация), короткие сроки наступления иммунитета, низкая себестоимость препарата (Сергеев В.А., 1993).

Общим недостатком вирусвакцин против оспы верблюдов, изготовленных вышеописанными производителями (живая вакцина - Ducarox®, живая культуральная вакцина из штамма Joutf-78, инактивированная ГОА вакцина из штамма «Т8»), являются не изученность их эффективности по отношению казахстанского изолята вируса оспы верблюдов, так как они никогда не применялись на территории Республики Казахстан.

Сущность изобретения

1. Задача. Разработка способа приготовления иммуногенной и безвредной эмбриональной вакцины против оспы верблюдов (ОВ) на основе аттенуированного штамма, полученного путем аттенуации эпизоотического штамма вируса ОВ, выделенного на территории Республики Казахстан, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью, пригодного для изготовления вакцинного препарата, создающего напряженный и длительный иммунитет у привитых животных против ОВ.

1.1 Решение поставленной задачи

1.1.1 Живую вакцину против ОВ готовят из аттенуированного штамма «КМ-40» вируса ОВ. Вакцинный аттенуированный штамм получен из эпизоотического штамма «М-96», выделенного от больных оспой верблюдов в 1996 году в

Мангыстауской области Республики Казахстан, путем проведения 40 последовательных пассажей на РКЭ (Булатов Е.А., 2010).

1.1.2 Способ наработки вирусной биомассы на РКЭ.

1.1.2.1 Способ получения вирусосодержащей суспензии штамма вируса оспы верблюдов в куриных эмбрионах

Для получения вирусосодержащей суспензии штамма РКЭ перед заражением их просвечивают (овоскопирование). Затем их скорлупу обрабатывают 70% этиловым спиртом, над пугой тонко отточенным металлическим копьем прокалывают отверстие и с помощью пинцета делают окошечко размером 4-5 мм в диаметре. После этого с помощью стерильных игл на ХАО в 2-3 местах делают насечки, и наносит вирусный материал в объеме по 0,2 мл. Отверстие в скорлупе эмбриона заклеивают лейкопластырем и инкубируют в вертикальном положении при температуре $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 120 час с относительной влажностью воздуха $(55 \pm 5)\%$.

Для контроля оставляют не зараженными 2-3 РКЭ, на ХАО которых наносят только физиологический раствор хлористого натрия, в том же объеме. Овоскопирование проводят ежедневно. Гибель эмбрионов в течение 48 ч считают неспецифичной. Начиная с 3-суточного срока инкубирования, погибшие эмбрионы помещают в холодильник при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и хранят до окончания опыта. Эмбрионы, оставшиеся живыми в течение 120 час, по истечении срока инкубирования охлаждают при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ не менее 18 час. Затем ножницами удаляют скорлупу в области пуги, вскрывают ХАО. После чего из яиц удаляют эмбрион, извлекают ХАО и при наличии на них характерных бляшек помещают во флаконы, содержащий 30-50 мл (в зависимости от количества ХАО) стерильного физиологического раствора с антибиотиками.

Флаконы с ХАО выдерживают в физиологическом растворе с антибиотиками при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ не менее 12 ч, гомогенизируют и замораживают при минус 40°C с последующим 3-кратным замораживанием и оттаиванием при комнатной температуре. Затем суспензию ХАО центрифугируют при 1000 об/мин в течение 20 мин. полученный надосадок разливают во флаконы. Для определения биологической активности и проверки стерильности полученной суспензии берут пробу в отдельный флакон. Основную вирусосодержащую суспензию во флаконах для получения результатов анализа и использования хранят при температуре минус 40°C .

1.1.3 Контроль отсутствия контаминации вирусного сырья бактериальной и грибковой микрофлорой проводят согласно ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы биологического контроля стерильности». Результат биологического контроля стерильности штамма КМ-40 стерильна в отношении бактериальной и грибковой микрофлоры.

1.1.4 Способ консервации вакцинного препарата методом лиофилизации.

Лиофилизацию технической жидкости (вирусодержащая суспензия с обезжиренным коровьем молоком в соотношении 1:1 (защитная среда)), разлитую в ампулы (объем лиофилизата 1 мл) проводят на лиофильной установке (Labconco, США) в автоматическом режиме в течение 22-24 ч при температуре минус 45-50°C с уровнем вакуума в камере лиофильной сушки 25-45 Па.

После высушивания ампулы запаивают при остаточном давлении от 15 ПА до 30 ПА.

Вакцина представляет собой лиофильно-высушенный препарат в виде таблеток, ампулу запаянной в условиях вакуума.

Наличие вакуума в ампулах проверяют аппаратом типа Д' Арсонваля. При этом должно наблюдаться фиолетово-синее свечение, сопровождающееся характерным потрескиванием.

1.1.5 Определение биологической активности вируса.

Биологическую активность вируса в наработанной суспензии определяют до лиофилизации и после, путем титрования в первичной культуре клеток ПЯ или РКЭ

1.1.5.1 Определение биологической активности в культуре клеток.

Для определения биологической активности в культуре клеток готовят 10-кратные разведения вирусосодержащего материала на поддерживающей среде ПСП и по 1 мл их вносят в пробирки с культурой клеток ПЯ, предварительно слив из них ростовую среду. Каждым разведением инфицируют по 4 пробирки с культурой клеток. В качестве контроля служат пробирки с культурой клеток этой же партии, в которые вносят только поддерживающую среду. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубируют при температуре (37±0,5)°C в стационарном положении, смену поддерживающей среды проводят по мере

необходимости. В качестве поддерживающей среды используют питательную среду ПСП, содержащей 600 мкг/мл глутамина, антибиотиков и инактивированной сыворотки КРС (2%). Результаты титрования учитывают на 3-7 сут после инфицирования по появлению специфических цитопатических изменений в зараженных культурах клеток и при отсутствии таковых в контроле. Титром вируса, считают наибольшее его разведение, вызывающее ЦПД в 50% зараженных пробирок с культурой клеток. Титр вируса вычисляют по методу Рида и Менча.

1.1.5.2 Определение биологической активности на 11-12-суточных РКЭ.

Для определения биологической активности на 11-12-суточных РКЭ готовят последовательные десятикратные разведения вируса на физиологическом растворе хлористого натрия. Каждым разведением вируса заражают по 4 эмбриона в объеме по 0,2 мл. На зараженных эмбрионах указывают название исследуемого материала и кратность его разведения, и инкубируют при температуре (37±0,5)°C с относительной влажностью воздуха 55% до 5 сут. Ежедневно проводят овоскопирование.

Инфицированные эмбрионы, погибшие впервые 48 ч, бракуют и при окончательном учете результатов их не учитывают. После 5 сут инкубирования зараженные РКЭ охлаждают при температуре (4±2)°C в течение 18 ч. По истечению этого времени эмбрионы вскрывают и определяют на ХАО наличие или отсутствие бляшек. При обнаружении характерных бляшек отмечают знаком «+» - (положительно), а при отсутствии «-» - (отрицательно).

Титром вируса считают наибольшее его разведение, образующиеся характерные бляшки на ХАО у 50 % зараженных эмбрионов.

Примерный расчет представлен ниже:

№ п/п	Разведение вируса						Биологическая активность в	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	ЭИД ₅₀ /0,2 мл	ЭИД ₅₀ /мл
1	++++	++++	++++	++++	++++	++ - -	6,00	6,70

Примечания:

1 «+» - наличие характерных бляшек;

2 «-» - отсутствие бляшек.

Вакцину считается пригодным, если биологическая активность не ниже 6,00 lg ЭИД₅₀/МЛ и при отсутствии контаминации посторонними микрофлорами.

1.1.6 Иммуногенность вакцины. Вакцину считают иммуногенной, если у трех верблюдов, привитых вакциной против ОВ в дозе 5·10⁴ ЭИД₅₀ через 14 сут после вакцинации в сыворотке крови выявляют специфические антитела к вирусу ОВ с титром ВНА не менее 2,50 log₂ против 100 ТЦД₅₀ вируса и все животные через 21 сут противостоят контрольному заражению без проявления клинических признаков болезни.

1.1.7 Безвредность вакцины. Вакцину считают безвредной, если при подкожном введении цельной вакцины десяти белым мышам массой 18-21 г в объеме 0,1 мл и пяти морским свинкам массой 700-800 г в объеме 0,5 мл, она не вызывает заболевания или гибели лабораторных животных в течение 10 сут наблюдения. На месте введения не должно быть никаких изменений подкожной клетчатки.

Кроме того, эмбриональная вирусвакцина безвредна для верблюдов при введении 10 прививных доз препарата. На 14 сутки после иммунизации в одной (10³ ЭИД₅₀) прививной дозы вакцины защищала верблюдов от заражения

вирулентным штаммом вируса оспы верблюдов в дозе 10^5 ЭИД₅₀.

Технический результат от использования предлагаемого изобретения заключается в расширении арсенала живых вакцин против ОВ, обладающих высокой иммуногенной активностью и безвредностью и создающих напряженный и длительный иммунитет у привитых животных против циркулирующих на территории республики эпизоотических изолятов вируса ОВ.

Достижение технического результата от использования предлагаемого способа объясняется тем, что при изготовлении живой вакцины против ОВ используют антигенный материал, аттенуированный штамм «КМ-40» вируса ОВ, обладающего высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью до лиофильной сушки и после, обеспечивающего получение высокоиммуногенной и безвредной вакцины, создающей напряженный и длительный иммунитет у привитых верблюдов сроком не менее 12 мес (срок наблюдения).

Дополнительный технический результат от использования предлагаемого изобретения в части сохранения антигенной, иммуногенной активности и длительного хранения целевого продукта в условиях бытового холодильника при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ достигается за счет использования в его составе обезжиренного коровьего молока в соотношении 1:1.

Штамм «КМ-40» депонирован в Коллекции микроорганизмов РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» КН МОН РК под регистрационным номером М-2-03/Д и запатентован в Национальном институте МЮ РК (№15410 от 14.08.2009 г.)

На основании разработанного способа была изготовлена экспериментальная серия эмбриональной вакцины против оспы верблюдов из штамма «КМ-40», которая проверена во

внутриинститутских комиссионных испытаниях и признана как иммуногенный и безвредный препарат, пригодный для профилактики оспы верблюдов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ приготовления эмбриональной вирусвакцины против оспы верблюдов из аттенуированного штамма вируса оспы верблюдов, включающий культивирование аттенуированного штамма вируса на харионаллантоисной оболочке (ХАО) куриных эмбрионов, осветление полученной суспензии вируса, определение ее биологической активности и стерильности в отношении посторонних миклофлор, добавление защитной среды, лиофилизацию, *отличающийся* тем, что используют гомологичный аттенуированный штамм «КМ-40» вируса оспы верблюдов с биологической активностью не ниже $6,00 \lg \text{ЭИД}_{50} / \text{мл}$, инкубирование инфицированных вирусом РКЭ проводят при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 120 ч с относительной влажностью воздуха $55 \pm 5\%$, собранные ХАО помещают во флаконы, содержащие 30-50 мл стерильного физиологического раствора с антибиотиками и выдерживают при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не менее 12 ч, гомогенизируют и замораживают при минус 40°C с последующим 3-кратным замораживанием и оттаиванием при комнатной температуре, затем суспензию ХАО центрифугируют при 1000 об/мин в течение 20 мин, в надосадок в качестве стабилизирующей среды добавляют стерильное обезжиренное коровье молоко в соотношении 1:1 и лиофилизируют в автоматическом режиме в течение 22-24 ч при температуре минус $45-50^\circ\text{C}$ с уровнем вакуума в камере 25-45 Па, после высушивания ампулы запаивают при остаточном давлении от 15 ПА до 30 ПА.