



МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0590.1

(22) 25.08.2020

(45) 15.10.2021, бюл. №41

(72) Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Хусаинов Дамир Микдатович; Шанбаев Бакдаулет Унербекович; Кулманбетов Куат Датембаевич; Иманбекова Толганай Абдикеримовна; Крыкбаев Еркин Алийбекович; Абдел Зият Жұмаділұлы; Аманбек Акерке Аманбекқызы

(73) Товарищество с ограниченной ответственностью «НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «АНТИГЕН»

(56) KZ 13392 (A), 15.09.2003

KZ 32411 B, 16.10.2017

RU 2244557 C2, 20.01.2005

KZ 2741 U, 02.05.2018

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

(57) Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, в частности, к изготовлению средств специфической профилактики бешенства животных, и может быть использовано для специфической профилактики бешенства сельскохозяйственных и домашних животных.

Целью изобретения является усовершенствование способа получения вакцины против бешенства животных.

Технический результат заключается в повышении безопасности и иммуногенности вакцины против бешенства животных.

Поставленная цель достигается тем, что способ включает культивирование вируса бешенства, при этом в качестве вирусосодержащего материала

используют референтный штамм вируса бешенства CVS-11, который вносят в количестве 0.1-0.01 МВД50/клетку одновременно с клетками ВНК-21 в концентрации 0.5-0.6 млн. кл/мл и выращивают в суспензии при 37°C при постоянном перемешивании в течение 5-6 суток, в среде следующего состава): среду Игла МЕМ (90%), сыворотку КРС (10%), кобальт хлористым, миоинозит, никотиновая кислота и солевой раствор Эрла, применение данных компонентов способствуют повышению чувствительности культуры клеток к вирусу бешенства путем адсорбционного эндоцитоза с увеличением антигенной активности, рН 7,5-7,6, сбор вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч., вирусную суспензию подвергают обработке ультразвуком циклами по 5 минут при 15-20 кГц в течение 25-30 мин, концентрирование супернатанта ультрацентрифугированием при 25000 об/мин и отделение вируса бешенства наслаиванием в ступенчатом градиенте сахарозы (15-50%) при температуре +25°C, в вирусную суспензию при температуре плюс 37°C вносят инактивант полиэтиленимин в конечной концентрации 0,25% и инкубируют при постоянном перемешивании суспензии в течение 24 ч, сорбцию инактивированного вируса проводят внесением 6% адьюванта MontanideTMISA 201 VG при конечной концентрации 10-20% с инкубацией в течение 12 ч при температуре плюс 4-8°C.

Иммуногенность вакцины в тесте НИИ и составляет не менее 2,0 МЕ. Вакцина безвредна и ареактогенна для сельскохозяйственных и домашних животных.

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии, в частности, к приготовлению средств специфической профилактики бешенства животных, и может быть использована для специфической профилактики бешенства сельскохозяйственных и домашних животных.

Известен способ получения вакцины против бешенства животных, включающий накопление вируса бешенства, обработку, инактивацию и сорбцию, при этом накопление осуществляют тканевым заражением баранов, дезинтеграцию фиксированного вируса бешенства в мозговой суспензии в присутствии сапонина при температуре 27-30°C, стабилизацию фиксированного вируса в присутствии раствора формалина при температуре 27-30°C, смешивание полученной суспензии с адьювантом - стерильным коллоидным раствором гидрата окиси алюминия на цитратно-фосфатном буфере, при этом в качестве фиксированного вируса бешенства используют вирус-фикс бешенства штамм "овечий" ВГНКИ, дезинтеграцию осуществляют в 4-5% мозговой суспензии в присутствии 0,07-0,15% сапонина в течение 20-36 часов, стабилизацию - в присутствии 0,03-0,05% раствора формалина в течение 20-36 часов, затем смешивают полученную суспензию с адьювантом - стерильным коллоидным раствором гидрата окиси алюминия на цитратно-фосфатном буфере с рН 7,0-7,4 в концентрации 24-25% (Предварительный патент РК № 13392. Способ получения вакцины против бешенства животных. Опубликовано:15.09.2003. МПК: С12N 1/00, А61К 39/205).

Недостатком данного способа является использование для репродукции вируса бешенства животных (овец), при этом получаемая вакцина низкоиммуногенна и высокореактогенна.

Целью изобретения является усовершенствование способа получения вакцины против бешенства животных.

Технический результат заключается в повышении безопасности и иммуногенности вакцины против бешенства животных.

Поставленная цель достигается тем, что способ включает культивирование вируса бешенства, при этом в качестве вирусосодержащего материала используют референтный штамм вируса бешенства CVS-11, который вносят в количестве 0.1-0.01 МВД50/клетку одновременно с клетками ВНК-21 в концентрации 0.5-0.6 млн. кл/мл и выращивают в суспензии при 37°C при постоянном перемешивании в течение 5-6 суток, в среде следующего состава (мас.):

Среда Игла MEM	30
Среда 199	30
Сыворотка крови крупного рогатого скота	10
Кобальт хлористый	0,1
Миоинозит	0,1
Никотиновая кислота	0,1
Солевой раствор Эрла	Остальное,

Сбор вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч. Вирусную суспензию подвергают обработке

ультразвуком циклами по 5 минут при 15-20 кГц в течение 25-30 мин, концентрирование супернатанта ультрацентрифугированием при 25000 об/мин и отделение вируса бешенства наплаиванием в ступенчатом градиенте сахарозы (15-50%) при температуре +25°C, далее вирусную суспензию при температуре плюс 37°C вносят инактивант полиэтиленимин в конечной концентрации 0,25% и инкубируют при постоянном перемешивании суспензии в течение 24 ч, сорбцию инактивированного вируса проводят внесением 6% Montanide™ISA 201 VG при конечной концентрации 10-20% с инкубацией в течение 12 ч при температуре плюс 4-8°C.

Пример конкретного выполнения.

Выращивание вируса бешенства референтный штамм CVS-11 проводят в культуре ВНК-21 с концентрацией 0.5-0.6 млн. кл/мл с одновременным внесением вируса в дозе 0.1-0.01 МЛД50/кл в суспензионной среде, содержащей, среду Игла MEM (90%), сыворотку КРС (10%), кобальт хлористый, миоинозит, никотиновая кислота и солевой раствор Эрла, рН 7,5-7,6, в ферментерах реакторного типа при температуре 37°C и постоянном перемешивании содержимого, и автоматическом поддержании рН среды в пределах 7.2-7.6. В течение первых трех суток наблюдается повышение концентрации инфицированных клеток до 1.8-2.2 млн. кл/мл, затем постепенная их гибель. Культивирование прекращают, когда жизнеспособных клеток во взвеси остается 18-20%.

В суспензионной культуре при посеве в концентрации 500 тыс. клеток на мл. обеспечивает 3-4 кратный прирост популяции на 3-4 сутки роста. При коэффициенте пересева 1:3 монослой формируется в пристеночных культурах на 2-3 сутки после посева и переживает не более 3-х дней.

Культивирование осуществляют при непрерывном перемешивании 90 об/мин. Сбор вирусной суспензии осуществляется через 72-96 ч. Вирусную суспензию подвергают замораживанию при температуре минус 70°C в течение 20-24 ч.

Инфекционная активность вируса бешенства штамма CVS-11 к этому времени составляет 6.6-6.7 lg МДЦ50/мл. Антигенная активность вирусного сырья из штамма CVS-11 составляет 1:180-1:270 в реакции ИФА.

Вирусную суспензию подвергают обработке ультразвуком циклами по 5 минут при 15-20 кГц в течение 25-30 мин, концентрирование супернатанта ультрацентрифугированием при 25000 об/мин и отделение вируса бешенства наплаиванием в ступенчатом градиенте сахарозы (15-50%) при температуре +25°C. Инактивацию проводят полиэтиленимином (polyethylenimine) с конечной концентрацией 0,03% при температуре 22-24°C, в течение 36 часов.

Сорбция инактивированного вируса проводится внесением 6% Montanide™ISA 201 VG при конечной концентрации 10-20% в течение 12 ч при температуре плюс 4-8°C. Готовая вакцина фасуется во флаконы в асептических условиях, укупоривается стерильными резиновыми пробками и обкатывается

алюминиевыми колпачками. Вакцина сохраняет свои иммуногенные свойства не менее 12 мес. при температуре плюс 4°C.

Введение вакцины сельскохозяйственным животным, а также кошкам и собакам сопровождается наработкой вируснейтрализующих антител в титрах не менее 1:16 по истечению 21 сут. после иммунизации.

Иммуногенность вакцины в тесте НИ и составляет не менее 2,0 МЕ. Вакцина безвредна и ареактогенна для сельскохозяйственных и домашних животных.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ приготовления вакцины против бешенства животных включающий накопление вируса бешенства, обработку, инактивацию и сорбцию, *отличающаяся* тем, что основой вакцины является штамм вируса бешенства CVS-11, которым заражают перевиваемую линию почки сирийского хомячка с концентрацией 0,9-1,0 млн. клеток/см³ в дозе 0,1-0,01 МЛД₅₀ на клетку, с последующим разбавлением до концентрации 0,4-0,5 млн.

клеток/см³ питательной средой и культивированием вируса в суспензии в течении 72-96 час до активности 7,5-8,5 I g МЛД₅₀/см³, вирусную суспензию подвергают обработке ультразвуком циклами по 5 минут при 15-20 кГц в течение 25-30 мин, концентрирование супернатанта ультрацентрифугированием при 25000 об/мин и отделение вируса бешенства наслаиванием в ступенчатом градиенте сахарозы (15-50%) при температуре +25°C, инактивацией полиэтиленмином в 0,25%-ной концентрации 24 ч, сорбцией инактивированного вируса на адьюванте Montanide™ISA 201 VG, с получением вакцины содержащей среду культивирования с инактивированным вирусом CVS-11 (85-90%), 6% Montanide™ISA 201 VG (10-20%), с иммуногенностью не менее 2,0 МЕ, при этом используется питательная среда следующего состава, мас.:. среду Игла MEM (90%), сыворотку КРС (10%), кобальтом хлористым, миоинозитом, никотиновой кислотой, солевой раствор Эрла, pH 7,5-7,6.