



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) **KZ** (13) **U** (11) **7240**
(51) **A61K 39/40** (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2022/0219.2

(22) 16.03.2022

(45) 01.07.2022, бюл. №26

(72) Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Исраилович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Нусупова Салтанат Тлектесовна; Есалинов Арыстанбек Нурболатулы; Есалинова Айым Ерланкызы; Алимов Айтбай Айткенович; Несипбаева Айгуль Кадировна; Майхин Кыдырбай Тажибаевич; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Утебаева Гульмира Нурлановна; Сабырбекова Шынар Касеновна; Мусаева Гульжан Каленовна; Базарбаев Рыскелди Канторевич; Мусоев Асилбек Маилибоевич; Куттымуратова Куралай Бисеновна; Несипханов Аслан Канатович; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Абжалиева Аида Болатбековна; Махашов Едиль

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

(56) RU 2438709 C1, 10.01.2012

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ ТЕЛЯТ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИРУСАМИ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА, ПАРАГРИППА, РОТА, КОРОНА И ДИАРЕИ**

(57) Полезная модель относится к области ветеринарной биотехнологии и может быть использована при получении сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых

вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Технический результат, обеспечиваемый полезной моделью, выражается в разработке способа получения высокоэффективной сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи включает иммунизацию животных-доноров путем введения в их организм антигена из слизистой слизистых оболочек бронхов и паренхимы легких телят, вируса инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи. В качестве животных-доноров используют волов-продуцентов. Иммунизацию вирусным антигеном проводят подкожно, в качестве инактиванта используют 0,2% полиэтиленмин, в качестве адъюванта 10% Монтанид-гель. Доза на всех этапах иммунизации нарастающая и составляет 5, 10, 15, 20 мл. Производственное крововзятие проводят при наличии антител в сыворотке крови продуцентов к тканям слизистых бронхов и паренхиме легких - не ниже 1:16 в РДП (реакция диффузной преципитации), к ротавирусу, вирусу диареи - не ниже 1:1600 в ИФА (иммуноферментный анализ), вирусу инфекционного ринотрахеита - не ниже 1:16 в РН (реакция нейтрализации), коронавирусу и вирусу парагриппа-3 не ниже 1:512 в РТГА (реакция торможения гемагглютинации).

(19) KZ (13) U (11) 7240

Полезная модель относится к области ветеринарной биотехнологии и может быть использована при получении сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Известен способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи включающий иммунизацию животных-продуцентов тканями слизистых оболочек бронхов и паренхимы легких телят, с последующим взятием крови и отделением сыворотки [Предварительный патент РК № 7049. Способ получения цитотоксической сыворотки для лечения и профилактики респираторных заболеваний. МПК А61К 35/16. Опубликовано: 15.02.1999].

Недостатком данного способа получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи является низкая лечебно-профилактическая эффективность.

Известен, принятый за аналог, способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи включающий иммунизацию животных-продуцентов антигенами из вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи, с последующим взятием крови и отделением сыворотки [Патент РФ № 2438709 С1. Сыворотка против болезней крупного рогатого скота, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи - болезни слизистых, полиспецифическая гипериммунная, способ профилактики и лечения болезней крупного рогатого скота, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи - болезни слизистых. - МПК А61К 39/40 (2000.01), А61К 39/42 (2000.01). Опубликовано: 10.01.2010, Бюл №1].

Недостатком данного способа получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи является низкая лечебно-профилактическая эффективность.

Задачей полезной модели является разработка способа получения высокоэффективной сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Технический результат, обеспечиваемый полезной моделью, выражается в разработке способа получения высокоэффективной сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых

вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи включает иммунизацию животных-доноров путем введения в их организм антигена из слизистой оболочек бронхов и паренхимы легких телят, вируса инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи. В качестве животных-доноров используют волов-продуцентов. Иммунизацию вирусным антигеном проводят подкожно, в качестве инвазиванта используют 0,2% полиэтиленмин, в качестве адьюванта 10% Монтанид-гель. Доза на всех этапах иммунизации нарастающая и составляет 5, 10, 15, 20 мл. Производственное крововзятие проводят при наличии антител в сыворотке крови продуцентов к тканям слизистых бронхов и паренхиме легких - не ниже 1:16 в РДП (реакция диффузной преципитации), к ротавирусу, вирусу диареи - не ниже 1:1600 в ИФА (иммуноферментный анализ), вирусу инфекционного ринотрахеита - не ниже 1:16 в РН (реакция нейтрализации), коронавирусу и вирусу парагриппа-3 не ниже 1:512 в РТГА (реакция торможения гематглютинации).

Способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи осуществляют следующим образом.

Пример 1 Способ изготовления антигенов для гипериммунизации волов-продуцентов.

Для получения антигена легких, слизистую оболочку бронхов и паренхимы легких, измельчают, промывают от остатков крови и гомогенизируют /при 1500 об/мин в течение 5 минут/, подвергают 5-кратному замораживанию и оттаиванию, центрифугированию при 1500 об/мин со сбором надосадочной жидкости. Далее добавляют 0,2% полиэтиленмин и выдерживаются в термостате при 37°C в течение 3 суток.

Ротавирус крупного рогатого скота размножают в роллерных трехлитровых бутылках с выросшей однослойной перевиваемой культурой клеток почки эмбриона ягнят, выращенные в роллерных трехлитровых бутылках на комбинированной среде, состоящей из среды 199 - 60%, ГЛА - 30% и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - 10. Культуру выращивают в течение 3-4 суток при посевной концентрации 100-120 тыс. клеток на 1 мл среды. Ростовую среду сливают, вносят в бутылки с культурой поддерживающую среду в количестве 350-370 мл и инкубируют при 37-38°C в течение 24-49 ч. После выраженного разрушения монослоя культуры клеток титр вируса должен составлять $10^{7.0}$ - $10^{7.8}$ ТЦД₅₀/мл. Для освобождения вируса культуру трехкратно замораживают при минус 18-20°C и в дальнейшем быстро оттаивают при 36-37°C. Полученную культуральную суспензию осветляют центрифугированием в течение 40 минут при 3000 об/мин.

Коронавирус крупного рогатого скота размножают в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона коров, выращенные в роллерных трехлитровых бутылках на комбинированной среде, состоящей из

среды 199 - 60%, ГЛА - 30% и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - 10%. Бутыли инкубируют в роллерной установке при 37-38°C в течение 3-4 дней. Через 72-96 ч выращивания при 37°C проявляется ЦПД 50%. Сбор культуральной жидкости производят в период выраженного цитопатического эффекта. Титр вируса должен составлять не ниже $10^{5.0}$ - $10^{5.8}$ ТЦД50/мл. Освобождение вируса из клеток осуществляют путем замораживания и оттаивания, полученную вирусную суспензию осветляют путем центрифугирования.

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота размножают в перевиваемой культуре клеток трахеи эмбриона коровы (ТР), выращенных в роллерных трехлитровых бутылках на комбинированной среде, состоящей из среды 199 - 60%, ГЛА - 30% и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - 10%. Культуру выращивают в течение 3-4-х суток при посевной концентрации 140-150 тыс. клеток на 1 мл среды. Бутыли инкубируют в роллерной установке при 37-38°C в течение 3-4-х дней. Титр вируса должен составлять не ниже $10^{5.0}$ - $10^{5.8}$ ТЦД50/мл. Освобождение вируса из клеток осуществляется путем замораживания и оттаивания, полученную вирусную суспензию осветляют путем центрифугирования.

Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота размножают в роллерных трехлитровых бутылках с выросшей однослойной перевиваемой культурой клеток почки эмбриона ягнят, выращенные в роллерных трехлитровых бутылках на комбинированной среде, состоящей из среды 199 - 60%, ГЛА - 30% и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - 10. Культуру выращивают в течение 3-4 суток при посевной концентрации 100-120 тыс. клеток на 1 мл среды. Ростовую среду сливают, вносят в бутылки с культурой поддерживающую среду в количестве 350-370 мл и инкубируют при 37-38°C в течение 24-49 ч. После выраженного разрушения монослоя культуры клеток титр вируса должен составлять $10^{7.5}$ - $10^{8.0}$ ТЦД50/мл. Для освобождения вируса культуру трехкратно замораживают при минус 18-20°C и в дальнейшем быстро оттаивают при 36-37°C. Полученную культуральную суспензию осветляют центрифугированием в течение 40 минут при 3000 об/мин.

Вирус диареи крупного рогатого скота размножают в перевиваемой культуре клеток трахеи эмбриона коровы (ТР), выращенных в роллерных трехлитровых бутылках на комбинированной среде, состоящей из среды 199 - 60%, ГЛА - 30% и эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота - 10%. Культуру выращивают в течение 3-4-х суток при посевной концентрации 140-150 тыс. клеток на 1 мл среды. Бутыли инкубируют в роллерной установке при 37-38°C в течение 3-4-х дней. Титр вируса должен составлять не ниже $10^{5.0}$ - $10^{5.8}$ ТЦД50/мл. Освобождение вируса из клеток осуществляется путем замораживания и оттаивания, полученную вирусную суспензию осветляют путем центрифугирования. Затем полученные антигены

смешивают в равных объемных соотношениях, добавляют 0,2% полиэтиленгликоль и выдерживаются в термостате при 37°C в течение 3 суток.

Пример 2. Гипериммунизация волов-производителей.

Волов, предназначенных для гипериммунизации, карантинируют, подвергают исследованию и необходимой обработке против инфекционных болезней согласно действующей инструкции о порядке заготовки и санитарной обработки животных, используемых для производства биопрепаратов. К эксплуатации допускают животных 2-5-летнего возраста, массой не менее 400 кг. Для гипериммунизации используют полиантигены, состоящие из слизистой из слизистых оболочек бронхов и паренхимы легких телят, вируса инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи. Перед этим к полиантигену добавляют адъювант 10% Монтанид-гель (MONTANIDE-GEL). Смесь антигенов вводится подкожно, четырехкратно в нарастающих дозах 5, 10, 15, 20 мл. Пробное взятие крови проводят из яремной вены в стерильные пробирки на 20-й день после последнего введения антигенов. Полученную сыворотку от каждого производителя с помощью серологических реакций исследуют на наличие антител. Производителям, в сыворотке которых титры антител ниже чем к слизистым оболочкам бронхов и паренхимы легких - 1:16 в РДП (реакция диффузной преципитации), к ротавирусу, вирусу диареи - болезни слизистых - 1:1600 в ИФА (иммуноферментный анализ), вирусу инфекционного ринотрахеита - 1:16 в РН (реакция нейтрализации), коронавирусу и вирусу парагриппа-3 - 1:512 в РТГА (реакция торможения гемагглютинации), вводят антиген повторно в дозах согласно последнему введению, а взятие крови не производят.

Пример 4. Взятие и обработка крови.

Производственное крововзятие разрешается при наличии антител в сыворотке крови производителей к тканям бронхов и легких - не ниже 1:16 в РДП (реакция диффузной преципитации), к ротавирусу, вирусу диареи - болезни слизистых - не ниже 1:1600 в ИФА (иммуноферментный анализ), вирусу инфекционного ринотрахеита - не ниже 1:16 в РН (реакция нейтрализации), коронавирусу и вирусу парагриппа-3 не ниже 1:512 в РТГА (реакция торможения гемагглютинации) и при условии температуры, не превышающей 39,5°C, а также после предварительной выдержки на голодной диете в течение 12 ч при неограниченном водопое. Первое крововзятие от производителей по объему не должно превышать 0,6 л крови на 100 кг живой массы животного, а в последующем - 1,6 л. На 20-й день после взятия крови производителям вводят полиантиген в дозах согласно последнему введению. Ежегодно делают перерыв в продолжение месяца в эксплуатации животных. Волов-производителей эксплуатируют в течение 3-5 лет, после чего их реализуют в установленном порядке. У волов- производителей кровь берут из яремной вены. Сыворотку отделяют общепринятым методом и консервируют.

Профилактические свойства сыворотки испытывают на 20 телятах, разделенных на 2 группы. Животным опытной группы (3 гол.) с профилактической целью сразу после рождения вводят двукратно с интервалом 12 часов полиспецифическую сыворотку в дозе 2 см³ на 1 кг живой массы. Телятам контрольной группы (2 гол.) в те же сроки и в тех же дозах - нормальную сыворотку крупного рогатого скота, серонегативную по отношению к возбудителям диареи. Спустя 30-36 ч после рождения телят обеих групп заражают перорально смесью культуральной рота-, корона-, ринотрахеита, диареи, а также парагриппа-3.

Лечебные свойства сыворотки изучают на 20 телятах, разделенных также на 2 группы. С этой целью телят обеих групп в первые 1,5-2 ч после рождения перорально заражают культуральными

взвесями рота-, корона-, ринотрахеита, диареи, а также парагриппа-3. С появлением первых клинических признаков диареи телятам опытной группы (3 гол.) вводят внутримышечно полиспецифическую сыворотку в дозе 2 см³ на 1 кг живой массы. Телятам контрольной группы (2 гол.) при появлении признаков болезни вводят внутримышечно нормальную сыворотку крупного рогатого скота в той же дозе, что и полиспецифическая. Результаты испытания лечебно-профилактических свойств сыворотки в остром опыте на телятах представлены в таблице 1. Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить сыворотку, эффективную для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи.

Таблица 1

Результаты испытания лечебно-профилактических свойств сыворотки

Название опыта	Всего голов	группы	Всего	Заболело голов/%	Пало голов/%
Профилактическая эффективность	20	опытная	10	3 (30%)	0 (0%)
		контрольная	10	9 (80%)	1 (10%)
Лечебная эффективность	20	опытная	10	10	0 (0%)
		контрольная	10	10	2 (20%)

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ получения сыворотки для лечения и профилактики болезней телят, вызываемых вирусами инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи, включающий иммунизацию животных-продуцентов антигенами из вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа, рота, корона и диареи, с последующим взятием крови и отделением сыворотки, **отличающийся** тем, что в качестве антигена дополнительно используют антиген из слизистой оболочки бронхов и паренхимы легких, при этом

антигены смешивают в равных объемах, в качестве инактиванта используют 0,2% полиэтиленмин, в качестве адьюванта 10% Монтанид-гель, доза на всех этапах иммунизации нарастающая и составляет 5, 10, 15, 20 мл, производственное крововзятие проводят при наличии антител в сыворотке крови продуцентов к тканям бронхов и легких – не ниже 1:16 в РДП, к ротавирусу, вирусу диареи - не ниже 1:1600 в ИФА, вирусу инфекционного ринотрахеита - не ниже 1:16 в РН, коронавирусу и вирусу парагриппа-3 не ниже 1:512 в РТГА.