

Изобретение относится к области ветеринарной медицины, в частности к способам получения вакцин против лейкоза крупного рогатого скота.

Среди заболеваний сельскохозяйственных животных, наносящих значительный ущерб народному хозяйству и представляющих серьезную проблему для животноводства, занимает хронический лимфолейкоз крупного рогатого скота.

Кроме того, вирус лейкоза крупного рогатого скота, как показывают исследования,

Обладает общностью свойств с вирусом Т-клеточного лейкоза человека, что представляет социальную опасность для человека и диктует необходимость создания надежных и эффективных средств борьбы и особенно профилактики этого заболевания.

Известны способы получения вакцин против лейкозных заболеваний у различных животных.

В частности известен способ получения вакцины для иммунизации птиц против лимфоидного лейкоза и эритробластоза путем получения смеси живых клеток и измельченных тканей, инфицированных этим вирусом в фармацевтической жидкости при содержании в 10 - 2000000 мл жидкости в 1 г смеси. В качестве исходного материала используют ткань почки, селезенки или печени больного животного (1).

Вакцина, полученная известным способом, не эффективна для предупреждения заболевания лейкоза крупного рогатого скота. Кроме того, вакцина содержит нуклеиновые кислоты как вирусного, так и клеточного происхождения, которые опасны как источник опухолевой информации с потенциальной возможностью индуцирования опухолевого заболевания.

Наиболее близким к описываемому является способ получения вакцины против лейкоза крупного рогатого скота, включающий выделение лейкоцитарной массы из периферической крови донора, больного хроническим лимфолейкозом, методом гемолитического шока эритроцитов с последующим восстановлением изотоничности раствора, культивирование полученных вирусосодержащих клеток путем их засева в культуральную жидкость следующего состава: инактивированная бычья сыворотка -10%, 0,5 лактальбумина 20%, среда Игла -70%, их выделение из культиуральной жидкости с последующим их механическим разрушением, обработку полученного лизата с одновременным инактивированием нуклеиновых кислот, содержащих тритон х-100 и выделение белковых фракций др25 и р70, используемых в качестве иммунизирующего агента диализом с добавлением полного адьюванта Фройнда (2).

Недостатком известного способа является низкий выход необходимых иммуногенных фракций р70 и др25, обусловленный применением диализа, приводящего к увеличению объема лизата и снижению качества антигенной активности полученной вакцины, понижающего ее иммуногенные свойства.

Кроме того способ предусматривает применение адьюванта Фройнда.

Известный способ технологически сложен, так как предусматривает многоступенчатость процесса получения вакцины при выделении как лейкоцитарной массы, так и белковой фракции, а также необходимость проведения дополнительных операций с целью получения очищенного вируса белковых фракций, что приводит к снижению ее антигенной активности и повышению себестоимости готовой продукции.

В основу изобретения поставлена задача усовершенствования способа получения вакцины против лейкоза крупного рогатого скота, позволяющего повысить иммуногенные свойства получаемой вакцины при одновременном упрощении технологического процесса ее получения.

Поставленная задача решается в способе, включающем выделение лейкоцитарной массы из периферической крови донора, больного хроническим лимфолейкозом, культивирование полученных вирусосодержащих клеток, их выделение из культуральной жидкости с последующим механическим разрушением, обработку полученного лизата детергентом тритон х-100 и выделение белковой фракции, используемой в качестве иммунизирующего агента.

Согласно изобретению, для выделения лейкоцитарной массы периферическую кровь донора вводят в 0,7-0,8 % раствор хлористого аммония в соотношении 1:4, выделенные из культуральной жидкости вирусосодержащие клетки, перед механическим разрушением разводят забуференным раствором в соотношении 1:1, обрабатывают вначале 10% 3М раствором хлористого калия, а затем тритон х-100, инкубируют при $4 \pm 1^\circ\text{C}$, повторно подвергают механическому разрушению. Полученный лизат, дополнительно разводят забуференным физраствором до конечного разведения 1:8 и подвергают инкубированию, осаждают центрифугированием и в качестве иммунизирующего агента используют белковые фракции р24 и др51, содержащиеся в осветленном лизате. Осветленный лизат сорбируют на адьюванте - геле гидроокиси алюминия и стабилизируют фенолом.

Заявленный способ позволяет получать лейкоцитарную массу, содержащую не только вирусные белки лимфолейкоза крупного рогатого скота, но и вирусиндуцированные белки клетки (лимфоцита), пораженные данной инфекцией.

Вакцина, получаемая предлагаемым способом, обладает двумя защитными функциями: цитотоксической и противовирусной активностью, что значительно повышает ее иммуногенные свойства, защищая организм от инфекции вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Кроме того, использование 0,7-0,8% раствора хлористого аммония в заявленном соотношении и выделение иммунизирующего агента предлагаемым способом с использованием дополнительного детергента 10% 3М раствора хлористого калия, позволяет увеличить выход титра иммуногенной белковой фракции за счет более полного разрушения вирусосодержащего лимфоцита с одновременным обеспечением разрушения и нуклеиновых кислот, делая вакцину безвредной для подлежащих иммунизации животных.

Способ реализуют следующим образом.

В качестве доноров используют крупный рогатый скот, отобранный из неблагополучного по лейкозу хозяйства, содержащийся на биопредприятиях, производящих вакцину, -а также кровь, полученную на мясокомбинатах от животных, инфицированных вирусом лейкоза.

Кровь получают из яремной вены в стерильные системы. Стабилизатором служит 3,8%-ный раствор трехзамещенного цитрата натрия, добавляемый из расчета 200 мл на 1 л крови. Кровь охлаждают в

холодильнике при $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Лейкоциты из цитратной крови выделяют посредством гемолиза эритроцитов 0,7-0,8%-ным раствором хлористого аммония. В 4 объема раствора хлористого аммония вводят 1 объем крови, при комнатной температуре выдерживают 7-10 мин. Лейкоциты осаждают центрифугированием при 1200-1500 об/мин в течение 10 минут. Осадок суспендируют в физиологическом растворе и промывают центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин - трехкратно. Осадок ресуспендируют в культуральной среде следующего состава: 10% инаktivированной бычьей сыворотки, 90% среды Игла, 100 ед. пенициллина на 1 мл среды. Доводят концентрацию до 2×10^7 в мл (максимальная концентрация 4×10^7).

Вирусосодержащие клетки культивируют в течение 48-72 часов на матрасах.

После культивирования клетки снимают с матрасов, встряхивают и выделяют из культуральной жидкости путем центрифугирования при 1600-1800 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость сливают, а осадок выделенных и подготовленных лейкоцитарных клеток хранят при температуре $-10-20^\circ\text{C}$.

Осадки вирусосодержащих клеток оттаивают, разводят забуференным раствором в соотношении 1:1 и подвергают механическому разрушению в гомогенизаторе Дауна (или другом аналогичного действия) в течение 3-5 мин.

К полученному лизату дополнительно добавляют забуференный раствор еще 2 объема, т.е. получаем разведение 1:4 и обрабатывают в начале лизирующим 10% 3М раствором хлористого калия в количестве 1/10 объема лизата, а затем, ранее приготовленным 10%-ным раствором тритона X-100 в количестве 1 мл раствора тритона X-100 на 100 мл лизата. Лизат инкубируют при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ на магнитной мешалке в течение 3-4 ч. Повторно подвергают механическому разрушению в гомогенизаторе. К полученному лизату вновь добавляют равный объем забуференного физиологического раствора, т.е. делают разведение 1:8. Тщательно размешивают и инкубируют при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ на магнитной мешалке в течение 3-4 часов.

Полученный лизат центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10-15 мин, или при 2000 об/мин в течение 25-30 мин. Осадок, содержащий безвредные отходы, выбрасывают.

От осветленного лизата производят забор 10 мл для дальнейшего определения в нем общего белка и наличия в нем антигена р24 ВЛКРС.

Осветленный лизат можно использовать в качестве вакцины, однако для усиления неспецифического стимулирующего действия вакцины на иммуногенез осветленный (основной материал лизата), содержащий белки р24 и рд51 ВЛКРС подвергают дальнейшей его обработке.

Белковые фракции собирают на адьюванте - геле гидроокиси алюминия.

Гель гидроокиси алюминия приготавливают следующим образом: сульфат аммония растворяют в дистиллированной воде, подогревают до 63°C . Алюминиевые квасцы также растворяют в дистиллированной воде и подогревают до 58°C . Подготовленные растворы смешивают, добавляют едкий натрий, нагревают до 61°C до получения однородной массы, которую подвергают центрифугированию с трехкратным отмыванием осадка дистиллированной водой. К полученному, промытому, плотному осадку добавляют забуференный раствор до 50% его разбавления.

Белковые фракции, с предварительным определением содержания в них белка - не менее 5 мг/мл по методу Лоури, собирают на приготовленном геле гидроокиси алюминия в течение суток при $+4^\circ\text{C}$, при периодическом перемешивании (на магнитной мешалке).

Адсорбированные белковые фракции подвергают трехкратному отмыванию забуференным физиологическим раствором центрифугированием при 1500 об/мин с разведением полученного конечного осадка забуференным раствором до исходного количества осветленного лизата, содержащего белковые фракции.

Через сутки, к полученной вакцине добавляют стабилизатор, в качестве которого используют фенол из расчета 2,5 мл на 100 мл лизата.

Полученная вакцина готова к употреблению через 12-14 суток.

Иммунизацию проводят внутримышечно, с интервалом 10-12 дней. Через четыре недели после третьего введения вакцины, в периферической крови иммунизированных телят констатированы цитотоксические (ЦТТ) и преципитирующие антитела к вирусиндуцированным и вирусным белкам рд51 и р24 в титрах 1:32 — 1:64. Напряженность иммунитета в РИД составляет 6 месяцев, а при применении более чувствительных методов (РИА) до 1 года.

Пример: 100 мл тщательно смешанной периферической крови донора вводят в 400 мл 0,8%-ного раствора хлористого аммония (соотношение 1:4) при комнатной температуре и выдерживают 10 минут. Лейкоцитарную массу осаждают центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 мин.

Осадок суспендируют в 100 мл физиологического раствора и промывают центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 минут - трехкратно.

Производят засев в культуральную среду следующего состава:

инаktivированная	
бычьей сыворотки	- 10%
среда Игла	- 90%
пенициллин	в расчете
	100 ед. на 1
	мл среды.
Концентрация клеток	до 2×10^7 в мл.

Выделенные вирусосодержащие клетки культивируют в 1,5 л матрасах.

Через 48 часов клетки снимают с матрасов встряхиванием и выделяют из культуральной жидкости центрифугированием при 1600 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок выделенных и подготовленных для получения вакцины вирусосодержащих клеток хранят при температуре $-10-20^\circ\text{C}$.

При получении вакцины, осадки клеток оттаивают, разводят физиологическим забуферением раствором в соотношении 1:1 и подвергают механическому разрушению в гомогенизаторе Дауна в течение 5 минут.

Полученный лизат обрабатывают приготовленным 10% 3М раствором хлористого калия из расчета 10 мл хлористого калия на 100 мл лизата, а затем тритоном X-100 до 1% конечной концентрации (т.е. 1 мл на 100 мл лизата). Обработанный лизат инкубируют при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ на магнитной мешалке в течение 24 часов. Повторно подвергают гомогенизации и инкубируют при тех же параметрах.

Полученный лизат разводят забуференным физиологическим раствором в соотношении 1:8. Тщательно размешивают и вновь инкубируют при $4 \pm 1^\circ\text{C}$ на магнитной мешалке в течение 3-4 часов.

Затем лизат осаждают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин. Осветленный лизат, содержащий белковые фракции р24 и др51 сливают, а осадок выбрасывают.

В белковой фракции, по методу Лоури (журнал Biological Chemistry 193, № 1, стр. 265, 1951 г.) определяют содержание белка, которого должно быть не менее 5 мг/мл.

Проводят сорбцию лизата, содержащего белковые фракции на предварительно подготовленный гель - 50% гидроокиси алюминия (из расчета на 100 мл лизата 20 мл гидроокиси алюминия) при периодическом перемешивании на магнитной мешалке в течение 12 часов. Адсорбированную белковую фракцию трехкратно отмывают забуференным физраствором центрифугированием при 1500 об/мин.

После последней отмычки доводят полученный осадок забуференным физиологическим раствором до исходного количества лизата с получением готовой вакцины, содержащей белки, сорбированные на гидроокиси алюминия, используемые в качестве иммунизирующего агента. Через 24 часа, к вакцине, из расчета 2,5 мл на 100 мл лизата, добавляют фенол:

Вакцина, полученная в соответствии с заявленным способом, была проверена при иммунизации 4-5 месячных телочек и нетелей-коров до 2-х летнего возраста в совхозе им. Кондратенко Полтавской области, что подтверждается актом испытаний (акт прилагается).

Как показали проведенные испытания, предлагаемый способ позволяет получать жидкую инактивированную, безвредную вакцину, обладающую двойной иммуногенной активностью:

- цитотоксической (определяемой в ЦТТ), направленную против инфицированных лейкозных клеток - лимфоцитов;
- противовирусной (антитела), направленную против вируса лейкоза крупного рогатого скота.

Кроме того, технологический процесс получения вакцины исключает необходимость проведения, для очистки белковых фракций, используемых в качестве иммунизирующих агентов, одного из трудоемких процессов - диализа, что в свою очередь, снижает себестоимость получения вакцины.