



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61780 (13) A

(51) 7 A61K39/255,C12N7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) БІВАЛЕНТНА ВАКЦИНА ПРОТИ ХВОРОБИ МАРЕКА

1

2

(21) 2003043586

(22) 21 04 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Стегній Борис Тимофійович, Білокінь Віктор Степанович, Герман В'ячеслав Валентинович, Вербицький Петро Іванович, Берус Павло Тихонович, Фісенко Світлана Анатоліївна, Заремба Олександр Васильович, Попов Володимир Миколайович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) 1 Бівалентна вакцина проти хвороби Марека, що містить суміш суспензій клітин, інфікованих штамом вірусу герпесу індичок (ВГІ) 3 серотипу і штамом вірусу герпесу курей (ВГК) 2 серотипу, сироватку крові великої рогатої худоби (ВРХ) і диметилсульфоксид, який відрізняється тим, що містить суміш суспензій клітин, інфікованих вірусом ВГІ (3 серотип) та ВГК (2 серотип)

2 Бівалентна вакцина по п 1, яка відрізняється тим, що як базовий компонент вакцина містить штам FC-126 ВГІ в ефективній кількості

3 Бівалентна вакцина за п 1, яка відрізняється тим, що як посилюючий компонент вакцина містить штам SBG ВГК (ІЕКВМ) в ефективній кількості

4 Бівалентна вакцина за п 1, яка відрізняється тим, що вакцина містить штам FC-126 вірусу герпесу індичок з біологічною активністю не нижче $1 \cdot 10^5$ ФУО/см³5 Бівалентна вакцина за п 1, яка відрізняється тим, що вакцина містить штам SBG вірусу герпесу курей з біологічною активністю не нижче $1 \cdot 10^5$ ФУО/см³

6 Бівалентна вакцина по п 1, яка відрізняється тим, що вакцина містить суміш суспензій фібробластів, вільних від патогенних факторів (ВПФ) ем-

бріонів курей, інфікованих штамом вірусу герпесу індичок FC-126 і штамом вірусу герпесу курей SBG (ІЕКВМ) сироватку крові великої рогатої худоби і диметилсульфоксид у наступному співвідношенні компонентів, мас. %

суспензія клітин, інфікованих FS-126 ВГІ - 38-45

суспензія клітин інфікованих SBG ВГК (ІЕКВМ) - 38-45

сироватка крові ВРХ - 8-12

диметилсульфоксид (ДМСО) - 5-12

7 Спосіб виготовлення вакцини проти хвороби Марека, що включає окреме інфікування клітин штамом вірусу герпесу індичок 3 серотипу і штамом вірусу герпесу курей 2 серотипу, інкубування зараженої культури, збір вірусомісної суспензії клітин з наступним їхнім об'єднанням, додаванням кріопротектора й одержанням цільового продукту, який відрізняється тим, що зі штамів 3 серотипу використовують штам вірусу герпесу індичок, сім Herpesviridae, рід Herpesvirus, FC-126 ВГІ в ефективній кількості

8 Спосіб за п 7, який відрізняється тим, що інфікують культуру клітин фібробластів ВПФ - ембріонів курей

9 Спосіб за п 7, який відрізняється тим, що одержують цільовий продукт зі вмістом штаму FC-126 вірусу герпесу індичок з біологічною активністю не нижче $1 \cdot 10^5$ ФУО/см³

10 Спосіб за п 7, який відрізняється тим, що зі штамів 2 серотипу використовують штам SBG (ІЕКВМ) вірусу герпесу курей в ефективній кількості

11 Спосіб за п 7, який відрізняється тим, що одержують цільовий продукт зі вмістом штаму SBG вірусу герпесу курей з біологічною активністю не нижче $1 \cdot 10^5$ ФУО/см³

Винахід відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології, може бути використаний при розробці і виготовленні засобів специфічної профілактики хвороби Марека

Хвороба Марека (ХМ) високо контагіозне, лімфопроліферативне, злоякісне, вірусне захворювання птахів. ХМ реєструється у всіх країнах світу, де розвинуте промислове птаховіництво, у тому числі й у нашій країні, викликаючи великі економі-

(19) UA (11) 61780 (13) A

чні збитки. Хвороба характеризується утворенням одиничних (у початковій стадії) і множинних пухлин у внутрішніх органах, шкірі, м'язах, а також змінами в центральній і периферичній нервовій системі курей. Вірус хвороби Марек (ВХМ) ушкоджує імункомпетентні органи (селезінку, тимус, бурсу) і має імундепресивні властивості, що призводить до зниження загальної резистентності птахів і підвищення їхньої чутливості до інших хвороб. У зв'язку з цим ХМ досить часто протікає в асоціації з іншими інфекціями. Важливим засобом попередження ХМ від захворювання є вакцинопрофілактика. Для специфічної профілактики використовують живі вакцини трьох типів із атенуйованих штамів ВХМ (серотип 1), із природноослабленого непатогенного ВХМ (серотип 2) і зі штамів вірусу герпесу індичок (ВП, серотип 3). Серотип 1 включає всі онкогенні віруси й атенуйовані варіанти ВХМ, серотип 2 - усі природноослаблені штам ВХМ, серотип 3 - антигенно споріднені ВХМ віруси герпесу індичок. Відома вакцина проти ХМ, що містить суспензію клітин фібробластів вільних від патогенних факторів (ВПФ) ембріонів курей (ФЕК), інфікованих штамом CVI-988 ВХМ 1 серотипу, сироватку крові великої рогатої худоби (ВРХ) і диметилсульфоксид (ДМСО) у якості кріопротектора (Сюрин В. Н. і др. Вирусные болезни животных - М. ВНИТИБП, 1998, С 713-715). Відома вакцина проти ХМ, що містить суспензію клітин ФЕК, інфікованих штамом SB-1 вірусу герпесу курей ВГК 2 серотипу, сироватку крові ВРХ і ДМСО (Сюрин В. Н. і др. Вирусные болезни животных - М. ВНИТИБП, 1998, С 713-715). Відома вакцина проти ХМ, що містить суспензію клітин ФЕК, інфікованих штамом FC-126 ВП 3 серотипу, сироватку крові ВРХ і ДМСО (Временная инструкция по изготовлению и контролю клеточной культуральной вирусвакцины против БМ из штамма FC-126 ВПИ Утверждена ГУВ МСХ СССР 04.06.84).

Відома вакцина проти ХМ, що містить суспензію клітин ФЕК, інфікованих штамом "ВНИВП" ВП 3 серотипу, сироватку крові ВРХ і ДМСО (Патент России № 2059404 А 61 К 39/255, 10.05.96).

Недоліки відомих вакцин полягають у тому, що вони не усувають носійства вірулентного вірусу. Обидва віруси (ВП і ВХМ) можуть одночасно персистувати в організмі птиці. Відомі вакцини не усувають небезпеки ураження лімфатичних органів птиці від високо вірулентних онкогенних штамів ВХМ.

Відомо, що бі- і полівалентні вакцини, що включають вакцинні штам групи ВХМ-ВП серотипів 1, 2 і 3, виявляють більш високу імуногенність у порівнянні з моновалентними, особливо проти дуже вірулентних польових штамів, що стають переважаючими в зонах інтенсивного птаховництва. Це обумовлено тим, що штам цієї групи *in vivo* виявляють протективний синергізм, тобто ефективність однієї вакцинної компоненти зростає від дуже низької дози іншої і навіть часткові дози двох штамів ефективніше повної дози одного штаму. Відомі дані про синергізм між штамом FC-126 (серотип 3) і SB-1 (серотип 2). Використання вакцини на основі зазначених штамів забезпечує більш високий захист проти ХМ у порівнянні із

сумішами штамів серотипів 1 і 3 чи 1 і 2 (Witter R. L. et al. Avian Pathol., 1984, 13, 1-75).

Відома полівалентна вакцина проти ХМ (патент России № 2059404 А 61 К 39/255, 10.05.96), що містить суміш суспензій клітин ФЕК, інфікованих штамом FC-126 ВП 3 серотипу і штамом "42" і/або "50", ВГК 2 серотипу, сироватку крові ВРХ і ДМСО в наступних співвідношеннях, мас. %

Суміш суспензій інфікованих клітин	- 80-90
Сироватка крові ВРХ	- 5-10
ДМСО	- інше

Недоліком даної вакцини є те, що вона не має досить високої імуногенної активності у господарствах з високим рівнем захворюваності на ХМ.

Найбільш близькою до винаходу, що передбачається, є бівалентна вакцина проти ХМ (патент России № 2144377 от 28.06.1999 А 61 К 39/255, С 12 N 7/00, "Бивалентная вакцина против болезни Марек и способ ее изготовления", авт. Куляш-Бенова Ш. К. и др.).

Ця рішення може бути прототипом. Вакцина містить як базовий компонент штам "ВНИ-ИЗЖ/110-ДЕП" вірусу герпесу індичок (ВП), а як посилюючий компонент, штам SB-1 ВГК, що містить суміш суспензій інфікованих клітин фібробластів ВПФ-ембріонів курей (ФЕК), сироватку крові великої рогатої худоби (ВРХ) та диметилсульфоксид (ДМСО).

Недоліком вакцини-прототипу є те, що в ній використовують російський штам, а не вітчизняний, та ще ця вакцина не вповні необхідною імуногенністю у птахогосподарствах з високим рівнем захворюваності на ХМ.

В основу винаходу поставлено задачу розробити бівалентну вакцину проти хвороби Марек, що містить суміш суспензій клітин, інфікованих ВП (3 серотип) та ВГК (2 серотип), сироватку крові ВРХ і ДМСО, шляхом використання як базового компоненту штаму FC-126 ВП, а посилюючого компоненту штам SBG ВГК (ІЕКВМ) в ефективній кількості.

Як клітинний субстрат вакцина містить культуру клітин ФЕК. Вакцина містить штам FC-126 ВП з біологічною активністю не нижче 10^5 ФУО/см³.

Вакцина містить штам SBG ВГК (ІЕКВМ) із біологічною активністю не нижче 10^6 ФУО/см³.

Вакцина містить суміш суспензій інфікованих клітин ФЕК, сироватку крові ВРХ і ДМСО в наступному співвідношенні компонентів, мас. %

суспензія клітин, інфікованих FC-126 ВП	38-45,
суспензія клітин, інфікованих SBG ВГК (ІЕКВМ)	38-45,
сироватка крові ВРХ	8-12,
ДМСО	5-12,

щоб забезпечити спосіб виготовлення бівалентної вакцини проти хвороби Марек.

Аналіз рівня техніки щодо патентних та науково-технічних джерел інформації дозволив зробити висновок, що рішення, яке заявляється, відповідає умовам патентоспроможності, "новизна" та "винахідницький рівень".

Спосіб виконується таким чином:

Для одержання клітинної суспензії і вирощування первинних культур клітин ФЕК і роздільного культивування штамів SBG ВГК (ІЕКВМ) і FC-

126 ВП використовують трипсин, сольовий розчин Хенкса чи Ерла, середовище Ігла, 0,5% розчин ГЛА на розчині Хенкса (ГЛАХ) чи Ерла (ГЛАЕ), середовище 199 і сироватку крові ВРХ. У якості ростового середовища використовують суміш з рівних об'ємів середовищ на основі підлізату лактальбуміну (ГЛА), Ігла і 199 з 10% сироватки крові ВРХ.

Як підтримуюче середовище для культивування штамів SBG ВГК та FC-126 використовують суміш з рівних обсягів середовищ на основі ГЛА, Ігла і 199 з 2% сироватки крові ВРХ.

Виготовлення виробничої серії вакцини включає чотири етапи: "освіження" і напрацювання вірусу в пасажах, знімання інфікованих клітин і формування серії вакцини, заморожування інфікованих клітин і контроль серії вакцини.

Освіження вірусу проводять двома послідовними пасажами. Для цього в культуральних судинах ємкістю 1,5 дм³ з моношаром культури клітин ФЕК проводять заміну ростового середовища на підтримуюче і вносять вірус з розрахунку для штаму SBG ВГК 200000 ФУО, для штаму FC-126 ВП 100000 ФУО. Кількість ампул, використовуваних для зараження, визначають виходячи з титру маточного штаму вірусу. Ампули дістають з рідкого азоту і негайно поміщають у воду з температурою 27°C до повного розморожування, потім ампули обробляють 3% розчином перекису водню, фламбують і розкривають. Вміст ампул поєднують і розводять живильним середовищем з розрахунку, щоб у кожному см³ суспензії містилося 10000 ФУО. Для першого пасажу необхідно заражати не менш 6 культуральних судин. Культуральні судини з зараженим моношаром клітин поміщають у термальні кімнати на три доби із ВП і 5-7 діб з ВГК. На час збору вірусу типова ЦПД у виді фокусів повинна бути чіткою видно під мікроскопом (30-50% ураження моношару). Із судин видаляють підтримуюче середовище і вносять підігріту до 37°C диспергуючу суміш (0,02% розчин Версену та 0,25% розчин трипсину у співвідношенні 9:1) з розрахунку 90-120 см³. Моношар змочують диспергуючим розчином протягом 1-3 хвилин, потім його швидко видаляють, а судини поміщають у термальну кімнату на 10-15 хвилин обертають при кімнатній температурі 5-10 хвилин зі швидкістю 20 об/хв. Після закінчення часу в судини вносять підтримуюче середовище без сироватки, енергійним струшуванням відшаровують клітини від скла і суспендують у ньому, не допускаючи їхнього розбризкування по поверхні культуральної судини. Потім проводять другий пасаж з розрахунку для ВП - 48-72 години, для ВГК - 98-120 годин. При 70-80% ураження моношару вірусом другого пасажу проводять знімання інфікованих кліток. Клітинну суспензію піддають центрифугуванню при 1000 об/хв протягом 10 хвилин, після цього видаляють диспергуючий розчин і у флакон вносять живильне середовище в невеликому обсязі (10 см³ на судину) без сироватки і ретельно ресуспендують осад кліток. Потім концентрацію кліток доводять до 10-12 млн/см³ підтримуючим середовищем. Концентрацію кліток визначають у камері Горяєва. Виробничий обсяг виробничий маточної розплідки

повинен бути не менш 500 см³. При необхідності проводять третій і четвертий пасажі.

У цьому випадку суспензією клітиннозв'язаного вірусу другого пасажу заражають моношарову культуру клітин (3 пасаж) з розрахунку до об'єму підтримуючого живильного середовища 1 10-1 20 для штаму FC-126 ВП і 1 20-1 50 для штаму SBG ВГК. Четвертий пасаж виконують з розрахунку 1 50-1 100 для штаму FC-126 ВП, 1 50 для штаму SBG ВГК. Культуру клітин, інфікованих штамом FC-126 ВП, інкубують протягом 48-72 годин, а культуру клітин, інфікованих штамом SBG ВГК - протягом 120 годин. Збір інфікованих клітин проводять так само, як і при зніманні вірусу другого пасажу. Після видалення диспергуючого розчину в судині вносять підтримуюче середовище з 20% сироватки крові ВРХ і 10% ДМСО. Суспензію інфікованих клітин, сироватку крові ВРХ і ДМСО беруть у співвідношенні 12 16-3 5-1 3 відповідно. Суспензії інфікованих клітин поєднують, при цьому концентрація інфікованих клітин у суспензії повинна бути 5-10 млн/см³ для штаму FC-126 ВП і 4,0-4,5 млн/см³ для штаму SBG ВГК. Зібрану суспензію інфікованих клітин розливають по 4 см³ у попередньо марковані ампули, закривають стерильною ватою, поміщають на кювет з льодом, запакують у полум'я газового пальника з наступним заморожуванням інфікованих клітин методом поступового зниження температури. Після цього ампули негайно занурюють у рідкий азот, поміщаючи їх в окрему посудину Д'юара чи в окремий контейнер ХБ.

Приклад 1

Контроль готової вакцини здійснювали відповідно до ТУ У. Для цього готували послідовні десятикратні розведення вірусу на живильному середовищі від 10¹ до 10⁵. Кожне розведення вірусу ретельно піпетували, не допускаючи утворення піни в пробірці, і по 0,5 см³ вносили у 3-5 флакони з моношаром клітин, попередньо звільнених від ростового середовища і залитих підтримуючим середовищем. Заражену культуру інкубували при температурі 39-40°C зі зміною підтримуючого середовища через 24 години. Через 4-5 доби після зараження клітинний моношар фарбували амідом чорним. Результати титрування враховували по наявності крапкових пофарбованих фокусів. Підраховували фокуси в 3-5 флаконах, що відповідали тому самому розведенню вірусу, у якому число фокусів не перевищує 100 і не менш 10.

Титр вірусу обчислювали за формулою

$$T = \frac{A \cdot 2}{P}$$

де Т - титр вірусу у ФУО/см³,

А - середня кількість фокусів у флаконі,

Р - розведення вірусу,

2 - коефіцієнт перерахування на 1 см³.

Титр базового компонента вакцини (штам SBG) і другого компонента (штам FC-126) повинен бути не нижче 1 10⁵ ФУО/см³. По титру встановлюють кількість імунізуючих доз у 1 см³. За одну прищепну дозу приймають 1000±100 ФУО для обох штамів.

Приклад 2

Отримана вакцина являє собою заморожену суспензію жовто-рожевого кольору, при розведенні являє собою гомогенну суспензію

Термін придатності бівалентної вакцини за умови збереження її в рідкому азоті 12 місяців

Приклад 3

Бівалентну вірусвакцину рідку культуральну застосовували з профілактичною метою. Вакцинували курчат в перші години після вибірки з вивідних шаф безпосередньо в інкубаторі

Перед проведенням щеплень пенал з бівалентною культуральною вірусвакциною обережно виймали із посудини Д'юара. Потім з пеналу витягували необхідну кількість ампул і швидко переносили у ємкості з водою при температурі 35-37°C

Після розморожування ампули розкривали, вакцину переносили у флакони з розріджувачем, що містить поліетиленгліколь, дотримуючись асептики. Розріджувач при змішуванні був охолоджений до температури холодильника 4-8°C

В кожному флаконі, що містить 160 см³ розріджувача, розводили 800 доз. Розведену вакцину в об'ємі 0,2 см вводили курчатам внутрішньом'язово у верхню третину стегна за допомогою ін'єктора напівавтоматичного чи шприцом обсягом 1 см³. Шприци і голки перед використанням стерилізували кип'ятінням у дистильованій воді протягом 10-15 хв

Приклад 4

Випробування імуногенності запропонованої вакцини проти хвороби Марек здійснювали на 110 однодобових курчатах породи "Род-Айланд", які були розділені на 4 групи й утримувались у віварії Інституту птахівництва УААН

Першій групі однодобових курчат (40 голів) щепили внутрішньом'язово суміш вірусів зі штамів SBG і FC-126 в об'ємі 0,2 см³ в дозі 700 і 1000 ФУО, відповідно

Другій групі однодобових курчат (40 голів) щепили внутрішньом'язово в об'ємі 0,2 см³ суміш вірусів, штамів SBG і FC-126 в дозі по 1000 ФУО кожного

Через 14 діб курчата першої, другої та третьої груп були заражені контрольним вірусом хвороби Марек епізоотичним штамом "Таганрог-2001" у дозі по 1000 ФУО в об'ємі 0,5 см³ внутрішньочеревно дворазово з інтервалом у 24 години

Четверту групу (20 голів) курчат не імунізували і не заражали вірусом (чистий контроль)

Імунізовані та контрольні групи курчат утримувались в окремих боксах. За ними здійснювали постійний нагляд. Через 5 діб після імунізації загинули 2 курчат (по одному з I й II груп) і одне курча з 4 групи (чистий контроль). При патологоанатомічному розтині виявлені ознаки ураження шлунково-

кишкового тракту, а при бактеріологічному дослідженні виділена кишкова паличка

У подальших спостереженнях за піддослідними курчатами захворювання і загибель курчат не реєструвалась, за винятком 3 групи (контроль патогенності вірусу), у якій виявлене 1 хворе курча з клінічними ознаками викривлення шиї, відкинутої назад голови, парезу кінцівок, дистрофії м'язів

Окрім цього, 2 голови з II групи піддослідних курей загинули відповідно на 92 і 173 добі, внаслідок ущемлення голів у чарунках кліток. При їх розтині виявлені зміни внутрішніх органів лише в півні у вигляді збільшення залозистого шлунку, геморагічного запалення кишок і атрофії тимусу з крапковими крововиливами

Приклад 5

Через 70, 90, 120 діб відібрано проби крові та проведено контрольний забій по 3 гол. із кожної піддослідної групи курей. Через 70 днів після імунізації з послідовним зараженням курей контрольним штамом вірусу ХМ "Таганрог-2001" виявлені ущільнення і набряк слизової оболонки залозистих шлунків у курей першої групи та в 2 голів третьої групи. У курок третьої групи (контроль патогенності контрольного вірусу) залозистий шлунок збільшений у 2 рази, жовчний міхур переповнений. Печінка має крапкові саловидні лімфомки, а тимус-саловидні розростання. У м'язах стегна виявлені саловидні пухлини до 2 см у діаметрі. Сідничний і нерв стегна набрякли, потовщені в 2-3 рази. За патологічними ознаками підтверджено діагноз на хворобу Марек

У курей IV групи (неімунізованих і незаражених контрольним штамом вірусу) патологічні зміни внутрішніх органів не виявлені

При контрольному забої курей через 90 діб незначні патологічні зміни у вигляді атрофії бурси, збільшення залозистого шлунку виявлені у 2 з 3-х курей III групи (контроль патогенності вірусу). При забої на 120 по 3 голови і залишку курей на 235 добі патологічні зміни в органах не виявлені

При дослідженнях проб сироватки крові, відібраних від піддослідних курей і досліджених у РНГА в лабораторії вивчення хвороб птиці ІЕКВМ, встановлено приріст специфічних антитіл у титрах від 1:4 до 1:16 (I-II групи), 1:8-1:32 (III група) при відсутності отаких у курей чистого контролю (IV група)

Бівалентна вакцина проти хвороби Марек та спосіб її виготовлення знайде використання при розробці і виготовленні засобів профілактики хвороби Марек у птахогосподарствах України, вакцина має високу імуногенність (98%), а технологія виготовлення вакцини є простіша та надійніша