



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

000215
ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ №

(19) **SU** (11) **1110168** . **A**

3(50) С 12 N 7/00, 7/06

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3565868/30-151

(22) 09.03.83

(71) Украинский ордена Трудового
Красного Знамени научно-исследова-
тельский институт экспериментальной
ветеринарии

(72) А.М. Цымбал, И.П. Лысенко,
К.Е. Конаржевский, Т.Н. Сербиненко,
В.С. Белокозь, П.Т. Берус,
Э.М. Прохорова, Г.Ф. Денисенко,
Н.В. Соколенко и А.Г. Денисенко

(53) 616.988.23:616.831.8 (088.8)

(56) 1. Авторское свидетельство ЧССР
№ 199365, 1976, кл. А 61 К 39/00.

2. Айрапетян В.Г. и др. Журнал
"Ветеринария", М., 1969, № 1, 34-36
(прототип).

(54) (57) 1. СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ
ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИ-

НЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЭСКИ, включающий
выращивание вируса болезни Ауэски на
культуре клетки СПЭВ, инактивацию
формалином, адсорбцию на геле гидро-
окси алюминия и консервирование гли-
церинном, о т л и ч а ю щ и й с я
тем, что, с целью повышения иммуно-
генности вакцины, инактивацию вируса
формалином проводят после его консер-
вирования глицерином.

2. Способ по п.1, о т л и ч а ю-
щ и й с я тем, что, адсорбцию виру-
са проводят на геле гидроокси алюми-
ния, содержащего 0,60-0,62% сухого
вещества при 4-8° в течение 18-20 ча-
сов.

3. Способ по п.1, о т л и ч а ю-
щ и й с я тем, что инактивацию виру-
са осуществляют формалином при 18-
30°С в течение 5-15 суток.

09 **SU** (11) **1110168** **A**



Изобретение относится к ветеринарной вирусологии, а именно к способу приготовления аинактивированных культуральных вакцин, применяемых для профилактики болезни Ауэски свиней, овец, и пушных зверей.

Известно, что качество инактивированных противовирусных вакцин (иммуногенная активность, безопасность, срок годности) во многом зависит от концентрации исходного вируса, а также метода его инактивации в вакцине.

При изготовлении аинактивированных вакцин против болезни Ауэски со сравнительно невысокой концентрацией вируса (менее 10^6 ЛД₅₀/мл для кроликов) для инактивации вируса успешно применяются разные химические вещества в условиях низкотемпературного режима инкубации [1].

Известен способ приготовления инактивированной вакцины против болезни Ауэски из вирулентного высококонцентрированного вируса ($10^{6,7}$ ЛД₅₀/мл и выше), заключающийся в одноименном смешивании вирусосодержащей культуральной жидкости, гидроокиси алюминия в 2%-ном разведении на фосфорно-буферном растворе, формалина, содержащего 37-40% формальдегида, в количестве 0,05% и выдерживании этой смеси при температуре не выше 10°C в течение 5 дней [2].

Эта вакцина выгодно отличается от вакцин, приготовленных другими способами, тем, что она обеспечивает образование прочного иммунитета против болезни Ауэски у разных видов животных в более короткие сроки (через

7-10 дней после однократной прививки) и на продолжительное время (до 6-11,5 месяцев после прививки).

Недостатком этой вакцины является не полностью надежный режим инактивации высококонцентрированного вируса, поскольку в этом режиме не предусмотрено наряду с химическими веществами фактора прогревания. Это может приводить к случаям производства небезвредных серий вакцины.

Целью изобретения является повышение иммуногенности вакцины.

Цель в способе приготовления инактивированной культуральной вакцины против болезни Ауэски, включающем выращивание вируса болезни Ауэски на культуре клеток СПЭВ, инактивацию формалином, адсорбцию на геле гидроокиси алюминия и консервирования глицерином, достигается тем, что инактивацию вируса формалином проводят после его консервирования глицерином.

Цель также достигается тем, что инактивацию вируса осуществляют формалином при 18-30°C в течение 5-15 сут.

Адсорбционные свойства гидроокиси алюминия изучали во взвесах при конечной концентрации сухого вещества 0,2-0,4-0,6-0,8 и 1% и количестве вируса 60% в расчете на весь объем вакцины. Адсорбцию вируса проводили при 4°C в течение 18 ч. Затем каждый образец центрифугировали при 3000 об/мин в течение 60 мин и в супернатанте определяли титрованием на культуре клеток СПЭВ концентрацию вируса болезни Ауэски (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Результаты изучения адсорбционных свойств гидроокиси алюминия в отношении вируса болезни Ауэски

Гидроокись алюминия во взвеси	0,2	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Титр вируса* в супернатанте, ТИД ₅₀ /мл	7,25	4	2,5	1,25	1,5	1,5

* Показатель отрицательной степени десятичного логарифма

Результаты опытов свидетельствуют о том, что максимальная адсорбция культурального вируса болезни Ауэски на гидроокиси алюминия (99,9%) в опи-

санных условиях происходит при концентрации сухого вещества 0,6%.

Температурный режим инактивации вируса изучали в образцах вакцины,

содержащей 60% культурального вируса болезни Ауэски (концентрация 10^8 ЛД₅₀/мл для кроликов), 0,6% гидроокиси алюминия, 20% х.ч. глицерина и 0,05% формалина. При этом сначала вирус адсорбировали на гидроокиси алюминия при +4°C в течение 18 ч, затем добавляли глицерин и формалин и помещали образцы при 8-10, 18-20 и 30°C. Периодически (через 3,5; 10, 15 сут) пробы каждого образца вакцины для проверки на полноту инактивации вируса вводили подкожно в дозе 3,0 мл двум кроликам (табл.2).

Т а б л и ц а 2

Результаты изучения температурных режимов инактивации вируса болезни Ауэски

Показатель	Температурный режим, °C		
	8-10	18-20	30
Срок полной инактивации вируса в вакцине, сут	в течение 15 сут	15	5
	вирус не инактивировался		

Данные табл.2 свидетельствуют о том, что в предлагаемой вакцине надежная инактивация вируса происходит при 30°C уже через 5 сут. Этот режим наиболее приемлемый в технологическом отношении по сравнению с другими изучаемыми режимами, был принят нами при изготовлении основных серий препарата.

Сравнительное изучение иммуногенной активности предлагаемой вакцины, содержащей различное количество исходного вируса, было проведено путем приготовления образцов вакцины, в состав которой входили гидроокись алюминия в количестве 0,6%, глицерин в количестве 20%, формалин в количестве 0,05% и исходный вирус (концентрация 10^8 ЛД₅₀/мл для кроликов) в количествах 10-25-50% и 60% (инактивацию вируса в вакцинах проводили при температуре 30°C в течение 5 суток), и испытания этих образцов на иммуногенность в опытах на поросятах 2-

4-х месячного возраста и овцах 6-18-месячного возраста. Поросят иммунизировали вакциной двукратно с интервалом между прививками в 7-8 дней в дозах 2,5-5 мл. Овцам вакцину вводили однократно в дозах 1-8 мл. Напряженность иммунитета у вакцинированных животных испытывали через 2-3 недели после окончания иммунизации путем заражения вирулентным вирусом поросят интрацеребрально, а овец подкожным способом.

При этом наиболее высокая иммуногенная активность, установлена в вакцине, содержащей 60% исходного вируса.

Таким образом, вакцина, приготовленная по предлагаемому способу, содержит следующие компоненты, %:

Вирусосодержащая культуральная жидкость с концентрацией вируса 10^8 - $10^{8,5}$ ЛД ₅₀ /мл для кроликов	60
Гидроокись алюминия с содержанием сухого вещества (6,0-6,2%)	10
Фосфатный буфер pH 7,6	10
Глицерин нейтральный х.ч.	20
Формалин, содержащий 40% формальдегида	0,05
Последовательность в составлении вакцины: вирус добавляют к смеси гидроокиси алюминия и фосфатного буфера, шуттелируют 15 мин, выдерживают при 4-8°C в течение 18-20 ч, добавляют глицерин, шуттелируют 15 мин, добавляют формалин, шуттелируют 15 мин, выставляют для инактивации при 18-30°C в течение 5-15 сут.	

Всего по предлагаемому способу было приготовлено 10 серий вакцин, из них 8 - в лабораторных условиях и 2 - опытные серии в условиях производства Ставропольской биофабрики.

Все серии вакцины были стерильными, безвредными и высокоиммуногенными. Иммунологическую активность лабораторной серии вакцины изучали в опытах на кроликах, поросятах 2-4 месячного возраста, овцах 6-18 месячного возраста.

Вакцина предохраняла от заболевания и гибели 100% кроликов, вакцини-

рованных однократно в дозе 8 мл при заражении их вирулентным вирусом болезни Ауэски в дозе 3-10 ЛД_{50} /мл для кроликов.

Из 25 поросят, иммунизированных вакциной двукратной в дозах 2,5-5 мл после интрацеребрального заражения вирусом болезни Ауэски осталось здоровыми 21 голова (84%), при заболевании 11 из 14 голов (78,6%) контрольных животных.

В опытах на 10 поросятах, иммунизированных вакциной, приготовленной по предлагаемому способу со сроком хранения 16 месяцев, после интрацеребрального заражения осталось здоровыми 9 голов (90%), при заболевании 7 из 10 голов (70%) контрольных животных.

В опытах на 55 овцах, иммунизированных однократно вакциной, приготовленной по предлагаемому способу в дозах от 1-8 мл, после заражения вирулентным вирусом осталось здоровыми 53 головы (96,3%), при гибели всех 14 голов контрольных овец.

В опытах на 30 овцах, предлагаемая вакцина испытывалась на скорость наступления и продолжительность создаваемого ею иммунитета. После контрольного заражения все вакцинированные овцы - 5 голов через 7 дней и 5 голов через 14 дней после однократной вакцины, а также 6 голов - через 6 месяцев и 4 головы - через 9 месяцев после двукратной прививки остались здоровыми, при гибели от болезни Ауэски всех 8 невакцинированных овец.

На Ставропольской биофабрике по предлагаемому способу приготовлено 2 опытных серии вакцины следующим образом.

Культуру перевиваемых клеток линии СПЭВ, выращенную в виде монослоя в матрасах объемом 1500 мл на ростовой питательной среде (среда 199, содержащая 10% сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотики - пенициллин по 100 Ед/мл и стрептомицин по 100 мкг/мл), после смены ростовой среды на поддерживающую (среда 199 с антибиотиками), заражали вирусом Ауэски 23-го пассажа (для вакцины серии № 1) и 24-го пассажа (для вакцины серии № 2) на клетках СПЭВ с множественностью заражения 0,7 ТЦД_{50} /клетка (5 мл вируса с титром $10^{-6,5}$ ТЦД_{50} /мл на 145 поддерживающей среды в каждый

матрас - всего 760 матрасов). Зараженные клетки в матрасе инкубировали в стационарном положении в термостате при 37°C до полной дегенерации и сползания клеточного монослоя вследствие цитопатического действия вируса, что происходило через 24-36 ч после заражения. Затем вирусосодержащую жидкость из каждого двух матрасов переливали во флаконы объемом 500 мл и производили высевы на питательные среды для проверки на бактериальную и микозную стерильность, а флаконы на период инкубации посевов (10 сут) выставляли в вертикальном положении в холодильнике при 4-6°C (для отстаивания вирусосодержащей жидкости и осаждения клеточного детрита). Оставшуюся вирусосодержащую жидкость со стерильных флаконов сливали в один сосуд, а оставшийся осадок со всех флаконов центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин и полученный супернатант добавляли к общей массе исходного вируса. Всего получено стерильного, освобожденного от клеточного детрита вируса - 96 л (титр этого вируса при последующей титрации на кроликах составил $10^{-2,5}$ ЛД_{50} /мл).

Вакцину составляли в баллонах объемом 18 л. Общий объем вакцины в каждом баллоне равнялся 10 л. Вначале в баллон вносили по 1 л гидроокиси алюминия, с концентрацией сухого вещества 6,2% - для первой серии и 6% - для второй серии вакцины, и фосфатного буфера pH 7,6 и эту смесь стерилизовали путем автоклавирования при 120°C в течение 60 мин. После остывания в баллоны с гидроокисью алюминия добавляли исходный вирус в количестве по 6 л, смесь шуттелировали 15 мин и выдерживали для адсорбции при 4°C в течение 18 ч для вакцины серии № 1 и - 20 ч для вакцины серии № 2. Затем в баллоны к адсорбированному вирусу добавляли по 2 л стерильного х.ч. нейтрального глицерина (глицерин стерилизовали накануне в автоклаве при 110°C в течение 60 мин), шуттелировали 15 мин, добавляли формалин в количестве 5 мл (0,05%) и снова шуттелировали 10 мин. Всего было составлено 8 баллонов вакцины 1-й серии и 8 баллонов вакцины 2-й серии. Баллоны с вакциной для инаktivации поместили в термостат при $30 \pm 0,1^\circ\text{C}$

на 120 ч, ежедневно содержимое баллонов дважды перемешивали. По истечении срока инаktivации вакцину из 8 баллонов первой серии и отдельно из 8 баллонов второй серии смешивали в реакторе и расфасовали во флаконы объемом 200 мл, которые герметически закупоривали, этикетировали и выставили для хранения при +4°C. По 15 флаконов вакцины обеих серий были отобраны государственным контролем Ставропольской биофабрики в контрольную лабораторию, где они были исследованы на стерильность (путем высевов на питательные среды), безвредность (путем подкожного введения вакцины в дозе 5 мл двум кроликам, массой 1,8-2 кг) и иммуногенную активность (путем внутримышечного введения вакцины в дозе 5 мл трем овцам и последующего их заражения через 2 недели вирулентным вирусом одновременно с двумя контрольными овцами). По результатам исследования контрольной лаборатории обе серии вакцины были стерильные, безвредные и иммуногенные (все вакцинированные овцы остались живыми и здоровыми, а контрольные овцы погибли от болезни Ауэски).

Предлагаемый способ обеспечивает приготовление инаktivированной куль-

туральной вакцины против болезни Ауэски, которая по сравнению с вакцинами, приготовленными известными способами, имеет следующие преимущества: полностью безопасна и безвредна в виду абсолютной надежной инаktivации в ней исходного вируса; имеет срок годности не менее 16 месяцев после изготовления против 7-10 месяцев у известных вакцин; обуславливает образование прочного иммунитета у всех вакцинированных животных к 7 дню после однократного введения против 7-10 дней и больше у известных вакцин; создает прочный иммунитет у вакцинированных животных продолжительностью более 9 месяцев после двукратной прививки против 6-11,5 месяцев у известных вакцин.

Это значительно повышает иммунологическую и экономическую эффективность вакцинопрофилактики болезни Ауэски у свиней, овец и пушных зверей.

Предложенный способ вполне подготовлен для промышленного использования на биофабриках МСХ СССР, производящих биопрепараты против болезни Ауэски, где и целесообразна его реализация.

Составитель С. Светлышев

Редактор С.Тимонина

Техред Л.Сердюкова

Корректор Е.Рожко

Заказ 1177/ДСП

Тираж 367

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д.4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4

2