



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119801** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
A61K 39/00
C12N 7/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 03528	(72) Винахідник(и): Музика Денис Васильович (UA), Стегній Борис Тимофійович (UA), Рула Олександр Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.04.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2017	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ", вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2017, Бюл.№ 19	

(54) ВІРУС-ВАКЦИНА-2 ПРОТИ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ ПТИЦІ (ХВОРОБИ ГАМБОРО) ЗІ ШТАМУ "УМ-93"

(57) Реферат:

Вірус-вакцина-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо) зі штаму "УМ-93" містить вірусмісний матеріал із авірулентного штаму "УМ-93" вірусу бурсальної хвороби, як стабілізатор - захисне середовище. При цьому як вакцинний штам використовують клонований штам "УМ-93", який був адаптований до курячих ембріонів, вільних від специфічних патогенних мікроорганізмів (КЕ ВСПМ).

UA 119801 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології та біотехнології і може використовуватися для профілактичної імунізації курчат 14-21-добового віку м'ясного та яєчного напрямків проти інфекційної бурсальної хвороби (хвороба Гамборо), а основними споживачами її є дрібнотоварні птахогосподарства різної форми власності.

Інфекційна бурсальна хвороба (ІБХ) - вірусна висококонтагіозна хвороба птиці, яка клінічно проявляється у курчат 2-15 тижневого віку, а найбільш уразливі курчата 3-6-тижневого віку, в яких вона протікає з високими показниками смертності. Супроводжується переважно діареєю, ураженням фабрицієвої сумки, значно менше - ураженням інших лімфоїдних органів, наявністю крововиливів в грудних м'язах, в м'язах крил, стегон та на слизовій оболонці на межі залозистого та м'язового шлунків. У курчат молодшого віку вона протікає м'якше, часто субклінічно, з можливими рецидивами захворювання внаслідок персистенції вірусу в фабрицієвій бурсі.

У вітчизняному птахівництві широко використовуються вірус-вакцини як вітчизняного, так і закордонного виробництва, такі як Галівак ІБХ, ТАД Гамборо вак форте, СЕВАК ІБХЛ, Пулвак Бурсин 2 (Ветеринарні імунобіологічні препарати: довідник / За заг. ред. П.І. Вербицького, А.М. Головка - К. Реферат, 2004. - 400 с.)

Недоліком всіх вище зазначених штамів вірусу ІБХ є те, що вони не є епізоотично актуальними для України, препарати, виготовлені на основі цих штамів, не гомологічні польовим вірусам, які циркулюють у нашій країні. Тому ці вакцини мають низьку антигенну та імуногенну активність.

Найбільш близькою за технічною суттю до корисної моделі, що заявляється, є вакцина проти ІБХ (Патент UA № 29843, А61К 39/00, С12Н 7/00 15.11.2000 р. Вакцина проти інфекційної бурсальної хвороби та спосіб її виготовлення). Для виготовлення цієї вакцини штам "УМ-93" було ізолювано з біологічного матеріалу, відібраного від курчат з птахофабрики Харківської області у 1992 році та адаптовано до гетерологічної біосистеми - перещеплювальної культури клітин нирки ембріону вівці. Ця вакцина може бути найближчим аналогом.

Недоліком є те, що вірус-вакцина із штаму "УМ-93" була призначена для профілактики захворювання на ІБХ в благополучних господарствах, а в умовах неблагополучних господарств, а також при наявності високого рівня материнських антитіл, ефективність її використання була недостатня. Також недоліком є те, що отримана вірус-сировина на культурі фібробластів КЕ або перещеплювальних культурах також значно поступається за імуногенністю ембріональному варіанту.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити вірус-вакцину-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо) зі штаму "УМ-93", яка містить вірусмісний матеріал із авірулентного штаму "УМ-93" вірусу бурсальної хвороби, як стабілізатор - захисне середовище шляхом використання як вакцинного штаму - клонований штам "УМ-93", який був адаптований до курячих ембріонів, вільних від специфічних патогенних мікроорганізмів (КЕ ВСПМ), щоб забезпечити ефективність вакцини.

Отримана таким чином вірус-вакцина була досліджена за всіма критеріями (реверсильність, нешкідливість, антигенна активність, імуногенність, стерильність та ін.), які прописані в міжнародних рекомендаціях та стандартах.

Реверсильність вакцинного штаму "УМ-93" була доведена шляхом наступних пасажів на 17-добових умовно ВСПМ курчатах шляхом випоювання з водою (ентерально в дозі $0,5 \text{ см}^3$ - $4,75 \text{ Іг ЕІД}_{50/0,2 \text{ см}^3}$) впродовж 5 пасажів (по 10 голів). Клінічних змін впродовж 14 днів спостереження або патологоанатомічних ознак хвороби під час розтину не виявлено. Виробничий штам вірусу ІБХ "УМ-93" до використання можна зберігати в ліофільному (сухому) стані за температури від 4 до 8 °С або рідкому стані за температури від мінус 20 до 196 °С.

Порівняльний аналіз корисної моделі, що заявляється, із найближчим аналогом дозволяє зробити висновок, що вірус-вакцина на основі вакцинного клонованого штаму "УМ-93", який було адаптовано до курячих ембріонів має більш високу імуногенну активність, є нешкідливою, використовується для ревакцинації поголів'я птиці.

Вакцину готують таким чином.

Процес отримання вірус-сировини для виготовлення біопрепарату полягає в отриманні "Матрової розплідки". Для цього рідкий виробничий штам вірусу ІБХ "УМ-93" освіжають шляхом одноразового пасажування на КЕ (ВСП) 9-добового віку (СОУ 01.2-37-196). Перед інфікуванням КЕ овоскопують і відбирають придатні для роботи - рухомі, з добре розвинутою судинною системою. Готують розведення вірусу 10^{-1} на фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) рН $7,2 \pm 0,1$ з антибіотиками, витримують впродовж 30 хв. за кімнатної температури. Після чого інфіковані КЕ інкубують у термостаті протягом 120 год. за температури 37 °С і відносній вологості (60-70) %. У процесі інкубації ембріони овоскопують раз на добу. Ембріони, які загинули впродовж перших

24 год., знищують. Через 120 год. інкубації усі ембріони охолоджують за температури 4 °С впродовж 18 год.

Перед розтином ембріони витримують 2 год. за кімнатної температури для випаровування вологи (конденсату) з поверхні шкарлупи, потім дезінфікують 70 % спиртом. Екстраембріональну рідину (ЕЕР), яка містить вірус відбирають у стерильний скляний флакон об'ємом 200 см³. Отриману "Матрову розплідку" перевіряють на відповідність паспортним даним (біологічна активність, стерильність) та зберігають в замороженому стані за температури мінус 70 °С до використання. Залишки після освіження вірусу знешкоджують шляхом автоклавування за температури 132 °С, 2 атм впродовж 60 хв.

Визначення біологічної активності "Матрової розплідки" проводять шляхом титрування вірусу на 9-10-добових КЕ. Для цього готують десятикратні розведення вірусу від 10⁻¹ до 10⁻¹⁰ на ФСБ з додавання антибіотиків. На кожне розведення використовують по 4 ембріони.

Ознаками біологічної активності вірусу вважають: затримку розвитку ембріонів, у порівнянні з контрольними, незараженими, крововиливи на голові, шкірі кінцівок тулуба, підшкірний набряк черевної порожнини. Титр вірусу розраховують за методом Ріда та Менча, який повинен бути не менше, ніж 6 lg ЕІД_{50/0,2 см³}.

Визначення контамінації бактеріальною або грибовою мікрофлорою "Матрової розплідки" проводять згідно з ДСТУ 4483 на тіогліколевому середовищі (ТГС), а на відсутність мікоплазм з використанням середовища Едварда (0,35 % агару) впродовж 3-х послідовних пасажів.

Перевірену на якість "Матрову розплідку" використовують для отримання вірусомісної сировини для виробництва вірус-вакцини.

Перед інфікуванням КЕ готують виробничу розплідку штаму вірусу інфекційної буреальної хвороби Гамборо "УМ-93", шляхом розведення "Матрової розплідки" вірусу (1000 ЕІД_{50/см³}), на фосфатно-сольовому буфері з антибіотиками (500 ОД/см³ пеніциліну, 500 мкг/см³ стрептоміцину), 25 ОД/см³ ністатину та витримують 30 хв. за кімнатної температури. Отриману виробничу розплідку вірусу готують в об'ємі, потрібному для зараження даної партії КЕ 9-10-добової інкубації.

Масово інфікуванні КЕ "Матровою розплідкою" інкубують у термостаті протягом 120 год. за температури 37 °С і відносній вологості 60-70 %. У процесі інкубації ембріони овоスコують два рази на день, у ранці та ввечері.

Через 5 діб інкубації курячі зародки охолоджують до температури 4 °С впродовж 18 год. Ембріони, які загинули впродовж перших 24 годин, знищують.

Перед розтином ембріони витримують 2 год. за кімнатної температури для випарювання вологи (конденсату) з поверхні шкарлупи. Розтин і відбір вірусомісного матеріалу (ХАО, алантоїсну рідину, тіло ембріону) проводять як зазначено вище. Вірусомісну рідину та ембріони збирають у стерильні скляні флакони ємністю 250 см³ по 450 см³.

Отриманий біоматеріал піддають 2-разовому заморожуванню та відтаюванню. Потім на гомогенізаторі проводять його подрібнення та подальше центрифугування впродовж 30 хв. за 5000 об/хв. Одержаний осад вилучають та знешкоджують, а надосадову рідину заморожують до використання та перевірки на якість та відповідності (титр біологічної активності, стерильність).

Після перевірки якості та відповідності вірус-сировини розморожений біоматеріал в кількості 20 % від загального об'єму вакцини змішують з 1 % розчином пептону (ГОСТ 13805-76) в кількості 40 % від загального об'єму вакцини та додають знежирене молоко (1,5 %) - 40 % від загального об'єму вакцини.

Сублімаційну сушку проводять впродовж 54 годин (перша фаза висушування проходила за мінусової температури - 36 год.; друга фаза проходила за плюсової температури та вакууму - 18 год.

Маркування споживчої тари вірус-вакцини здійснюють згідно з ДСТУ 4614.

Контроль якості та відповідності НД проводять згідно з "Інструкцією з виготовлення та контролю вірус-вакцини" у відділі біологічного контролю (ВБК) виробника біопрепарату за зовнішнім виглядом, кольором, наявністю тріщин флаконів та сторонніх домішок, плісняви, зміни консистенції, розчинності, масової частки вологи, стерильністю, нешкідливістю, антигенної та імуногенної активності.

Отримана таким чином вірус-вакцина була досліджена за всіма критеріями (реверсильність, нешкідливість, антигенна активність, імуногенність, стерильність та ін.), які прописані в міжнародних рекомендаціях та стандартах. Вірус-вакцина являє собою суху, пористу масу блідо-рожевого кольору.

Приклад 1. Визначення біологічної активності вірус-вакцини

Дослідження щодо біологічної активності вірус-вакцини проводили у стерильних умовах шляхом серійного розведення імунобіологічного препарату від 10⁻⁵ до 10⁻¹⁰. Кожним

розведенням вірусу заражали по 4 ембріони у хоріоалантоїсну порожнину в дозі 0,2 см³, а 5 ембріонів використовували, як контроль, і вводили аналогічну дозу фізіологічного розчину.

Біологічна активність вірусу повинна бути не менше, ніж була 6,0 lg ЕІД_{50/0,2 см³}.

Приклад 2. Визначення нешкідливості та реактогенності вірус-вакцини

5 Дослідження щодо нешкідливості та реактогенності вірус-вакцини проводили на двох групах курчат (по 10 голів) 14-добового віку. Першій групі курчат вакцину вводили інтраокулярно в дозі 0,2 см³ (10 кратна доза), а другій (контроль) фізіологічний розчин. За курчатами спостерігали впродовж 14 діб (табл. 1). Впродовж вказаного терміну у курчат обох груп не відмічені клінічні ознак ІВХ та загибелі (пригнічення, скуйовдженість пір'я, пронос).

10 3 появою високовірулентних штамів вірусу ІВХ, а також широке використанням інактивованих вакцин батьківським стадам птиці змінили і епізоотологічний прояв захворювання - інфекцію стали реєструвати у курчат в більш старшому віці (30 діб та старших вікових груп). Вакцинація птиці проти ІВХ з високим не однорідним імунітетом (пасивні антитіла) викликає формування імунітету лише у деякої частини стаду птиці, тоді як ревакцинація стимулює захисні сили у більшості поголів'я. Тому програма вакцинацій проти ІВХ, а особливо це стосується зон з високою ймовірністю прояву зазначеного збудника включає ревакцинацію поголів'я птиці.

Приклад 3. Визначення імуногенності вірус-вакцини

20 Дослідження щодо імуногенності вірус-вакцини проводили на щепленій (вакцинованій у 17-добовому віці та ревакцинованій через 10 діб) та контрольній птиці. Курчат обох груп (по 10 курчат) інфікували інтраназально вірулентним штамом вірусу хвороби Гамборо "52/70" (1000 ЕІД_{50/0,2 см³}). Спостереження за курчатами проводили впродовж 14 діб (табл. 2).

Впродовж спостереження вакциновані курчата після інфікування вірулентним штамом вірусу залишились клінічно здоровими, а контрольні не вакциновані захворіли у 100 %.

Приклад 4. Визначення антигенної активності вірус-вакцини.

25 Для встановлення антигенної активності вірус-вакцини використовували дві групи курчат по 10 голів. Перша група була щеплена (вакцинована та ревакцинована), а друга була контрольна - не вакцинована.

30 Через 14 діб після ревакцинації у курчат асептично відбирали проби крові з підкрильцевої вени. Дослідження сироваток крові на наявність антитіл до вірусу хвороби Гамборо визначали за допомогою тест-системи виробництва "IDEXX" (табл. 3). Як видно з таблиці 3, проєктивні титри антитіл виявлені у 100 % щепленої птиці.

35 Таким чином, були отримані результати, які свідчать про те, що ця вірус-вакцина відповідає всім вимогам з якості, здатна викликати напрацювання специфічних антитіл у імунізованій птиці в високих титрах (антигенноактивна) та при інфікуванні птиці високовірулентним вірусом ІВХ забезпечує 100 % захист птиці проти даної інфекції і може використовуватися у птахівництві.

Таблиця 1

Вірус-вакцина-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо) зі штаму "УМ-93"

Доба спостереження	Перша група курчат	Друга група курчат
1	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
2	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
3	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
4	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
5	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
6	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
7	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
8	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
9	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
10	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
11	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
12	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
13	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
14	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні

Таблиця 2

Вірус-вакцина-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо)
зі штаму "УМ-93"

Доба спостереження	Перша група курчат	Друга група курчат (контроль)
1	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
2	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
3	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
4	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
5	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відсутні
6	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 2 курчати
7	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 2 курчати
8	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 5-х курчат
9	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 6 курчат (2 курчати загинуло)
10	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 7 курчат (2 курчати загинуло)
11	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 7 курчат (3 курчат загинуло)
12	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 6-х курчат (4 курчати загинуло)
13	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 6-х курчат (4 курчати загинуло)
14	ознаки захворювання відсутні	ознаки захворювання відмічені у 6-х курчат (4 курчати загинуло)

Таблиця 3

Вірус-вакцина-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо)
зі штаму "УМ-93"

№ п.п	вакцинована птиця			не вакцинована птиця		
	LgT	T	Результат	LgT	T	Результат
1	3,01	1021	+	2,25	178	±
2	3,35	2238	+	2,00	100	-
3	3,12	1321	+	1,84	69	-
4	3,02	1043	+	2,57	369	+
5	3,31	2063	+'	2,20	158	-
6	3,22	1649	+	2,57	369	+
7	3,32	2110	+	2,07	117	-
8	3,16	1456	+	-	-	-
9	2,89	782	+	2,45	279	+
10	3,17	1489	+	2,25	178	±
Інтерпретація результатів ІФА						
T			результат			
до 395 включно			негативний			
від 396			позитивний			

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Вірус-вакцина-2 проти інфекційної бурсальної хвороби птиці (хвороби Гамборо) зі штаму "УМ-93", яка містить вірусвмісний матеріал із авірулентного штаму "УМ-93" вірусу бурсальної хвороби, як стабілізатор - захисне середовище, яка **відрізняється** тим, що як вакцинний штам використовують клонований штам "УМ-93", який був адоптований до курячих ембріонів, вільних від специфічних патогенних мікроорганізмів (КЕ ВСПМ).

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601