



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004101590/13, 19.01.2004  
 (24) Дата начала действия патента: 19.01.2004  
 (45) Опубликовано: 20.11.2005 Бюл. № 32  
 (56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2095083 C1, 10.11.1997. RU 2137499 C1, 20.09.1999.  
 Адрес для переписки:  
 600901, г.Владимир, п. Юрьевец, ФГУ ВНИИЗЖ, К.Н. Груздеву

(72) Автор(ы):  
 Мищенко В.А. (RU),  
 Миськевич Степан Владимирович (UA),  
 Скибицкий Владимир Гурьевич (UA),  
 Окулова О.Н. (RU),  
 Жбанова Т.В. (RU),  
 Никешина Т.Б. (RU)  
 (73) Патентообладатель(ли):  
 Федеральное государственное учреждение  
 "Федеральный центр охраны здоровья  
 животных" (ФГУ ВНИИЗЖ) (RU)

(54) ШТАММ N101 ВНИИЗЖ ROTAVIRUS КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ, ВАКЦИННЫХ И ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

(57) Реферат:  
 Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и биотехнологии. Штамм обладает высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью, доминирующими свойствами над эпизоотическими изолятами. Штамм депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов ВГНКИ МСХ РФ под регистрационным №101 ВНИИЗЖ-ДЕП. Вирус штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП репродуцируется в монослойных перевиваемых культурах клеток

MDBK, СПЭВ, ПСГК-30, Vero, Marc-145 и КСТ, в которых в течение 24-48 часов инкубирования накапливается в титрах 5,5-7,5 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП сохраняет исходные биологические свойства при пассировании в культуре клеток. Технический результат: повышение биологической, антигенной и иммуногенной активности штамма, его стабильности при инактивации и доминантности над эпизоотическими изолятами, а также расширение арсенала производственных штаммов ротавируса КРС. 12 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 264 458** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **C 12 N 7/00, A 61 K**

**39/15//C 12 N 7/00, C 12 R 1:92**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2004101590/13, 19.01.2004**

(24) Effective date for property rights: **19.01.2004**

(45) Date of publication: **20.11.2005 Bull. 32**

Mail address:

**600901, g.Vladimir, p. Jur'evets, FGU  
VNIIZZh, K.N. Gruzdevu**

(72) Inventor(s):

**Mishchenko V.A. (RU),  
Mis'kevich Stepan Vladimirovich (UA),  
Skibitskij Vladimir Gur'evich (UA),  
Okulova O.N. (RU),  
Zhanova T.V. (RU),  
Nikeshina T.B. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
"Federal'nyj tsentr okhrany zdorov'ja  
zhivotnykh" (FGU VNIIZZh) (RU)**

(54) **CATTLE ROTAVIRUS STRAIN FOR PRODUCTION OF DIAGNOSIS, VACCINE AND THERAPEUTIC PREPARATIONS**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary virology and biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to rotavirus strain having high biological, antigenic, and immune activity, as well as dominated properties in relation to epizootic isolates. Claimed virus strain is reproduced in single-layer passed cell cultures wherein after incubation for 24-48 h it accumulates in titer of 5.5-7.5 lg TCD<sub>30</sub>/cm<sup>3</sup>. (TCD -

tissue cytopathogenic dose). Strain of present invention holds basic biological properties when passing in cell culture.

EFFECT: strain with increased biological, antigenic, and immune activity, inactivation resistance and dominated properties in relation to epizootic isolates.

12 tbl, 5 ex

**RU 2 264 458 C1**

**RU 2 264 458 C1**

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии и биотехнологии и может быть использовано при разработке и изготовлении средств диагностики, специфической профилактики и лечения ротавирусной инфекции крупного рогатого скота (КРС).

Ротавирусная инфекция КРС (ротавирусный энтерит, диарея неонатальных телят) - остропотекающая контагиозная болезнь новорожденных телят, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта.

Болезнь широко распространена во всех странах мира и наносит большой экономический ущерб промышленному животноводству за счет высокого уровня заболеваемости телят (50-78%), смертности до 25-53% в результате диареи, потери массы животных и снижения сопротивляемости другим инфекциям.

Чрезвычайно широкое распространение возбудителя заболевания, его приспособленность к паразитированию в организме некоторых видов животных, тенденция вызывать длительную персистенцию, антигенная полиморфность и относительная устойчивость к воздействию разнообразных факторов обуславливают энзоотическое течение болезни в хозяйствах с неблагоприятными условиями содержания животных.

Стационарность болезни поддерживается за счет длительной персистенции возбудителя в организме животных-реконвалесцентов.

Важные условия успешной борьбы с этим заболеванием - своевременная и правильная его диагностика, проведение мер специфической профилактики, что в свою очередь предполагает получение в достаточном количестве активного вирусного антигена.

Для специфической профилактики ротавирусного энтерита применяют живые и инактивированные вакцины, которыми прививают глубокостельных коров. При этом практическое значение для профилактики ротавирусной диареи новорожденных телят имеет колостральный иммунитет, обусловленный поступлением с молозивом в организм новорожденных телят специфических антител, нейтрализующих возбудитель в просвете тонкого кишечника, а также иммунокомпетентных клеток и других протективных факторов.

Ротавирусы КРС характеризуются значительным антигенным полиморфизмом и нестабильностью антигенной структуры. Сложная структура генома ротавируса, в том числе его фрагментарность, обуславливают постоянную возможность модификации антигенной структуры. Ротавирусы нейтрализуются гомологичными сыворотками в более высоких титрах, чем гетерологичными. При выборе производственного штамма с помощью реакции нейтрализации (РН) результаты, полученные при исследовании сыворотки с гетерологичными штаммами, более важны, чем результаты нейтрализации ротавируса гомологичными сыворотками.

Одним из основных требований, предъявляемых к производственным штаммам, является соответствие их антигенных свойств эпизоотическим штаммам возбудителя. Производственный штамм должен обладать широким антигенным спектром и доминировать над эпизоотическими. Возбудитель должен быть хорошо адаптированным к системе культивирования и обладать высокой антигенностью. Вакцины, изготовленные из таких штаммов, должны защищать животных против нескольких отличающихся штаммов возбудителя заболевания (1).

Известен штамм Nebraska (Nebraska calf diarrheal virus, NCDV, он же Линкольн) ротавируса КРС, выделенный в 1969 году от теленка с диареей в США и используемый для изготовления диагностических и вакцинных препаратов (2-14).

Известен штамм "Тиверваль" ротавируса КРС для изготовления диагностических препаратов (15, 16, 17).

Известен штамм 81/36F ротавируса КРС для изготовления вакцинных препаратов (18).

Известен штамм SA-11 ротавируса обезьян для изготовления вакцинных препаратов (19).

Известны также штаммы G6 P5 и G10 P11 ротавируса КРС для изготовления вакцинных препаратов (20).

Наиболее близким к предлагаемому изобретению по совокупности существенных признаков является штамм Nebraska, он же NCDV, он же Линкольн, ротавируса КРС для

изготовления диагностических и вакцинных препаратов (2-14).

Недостатки штамма-прототипа состоят в его антигенных отличиях от эпизоотических изолятов ротавируса КРС, выделенных на территории России и Государств СНГ в различные временные промежутки.

5 В связи с этим актуальной остается проблема поиска новых штаммов ротавируса для производства высокочувствительных и специфичных средств диагностики, высокоиммуногенных, безвредных и ареактогенных средств профилактики и лечения заболевания.

10 Является доказанным, что при выборе производственных штаммов возбудителя необходимо учитывать доминантность.

Доминантность - это способность определенного штамма возбудителя, используемого для изготовления вакцины, создавать защиту против нескольких отличающихся вариантов того же возбудителя.

15 В задачу создания настоящего изобретения входило получение нового производственного штамма ротавируса КРС, обладающего высокой биологической, антигенной, иммуногенной активностью и широким антигенным спектром, что позволяет ему доминировать над эпизоотическими штаммами.

20 Технический результат от использования предлагаемого изобретения заключается в повышении биологической, антигенной и иммуногенной активности и стабильности штамма при инактивации в процессе изготовления биопрепаратов и доминантности над эпизоотическими штаммами, а также расширении арсенала производственных штаммов ротавируса КРС.

25 Указанный технический результат достигнут получением штамма №101 ВНИИЗЖ ротавируса КРС. Штамм №101 ВНИИЗЖ ротавируса КРС является новым, ранее неизвестным.

Исходный ротавирус для получения штамма №101 ВНИИЗЖ выделен из фекалий новорожденного теленка с нарушением функции желудочно-кишечного тракта.

Производственный штамм №101 ВНИИЗЖ ротавируса КРС получен путем адаптации к перевиваемой культуре клеток почек теленка MDBK.

30 Полученный штамм депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) МСХ РФ 12 марта 2001 под регистрационным №101 ВНИИЗЖ-ДЕП.

35 По сравнению с прототипом штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС обладает более высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью, а также доминирует над эпизоотическими изолятами.

40 Экспериментально подтверждена возможность его использования для изготовления средств диагностики, специфической профилактики и лечения ротавирусной инфекции КРС.

Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС характеризуется следующими признаками и свойствами.

Морфологические свойства

45 Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС относится к семейству Reoviridae, роду Rotavirus и обладает морфологическими признаками, характерными для возбудителя ротавирусной инфекции КРС: сферическая форма диаметром 65-75 нм, имеющая вид "колеса". Вирион состоит из сердцевины, внутреннего и наружного капсида. Сердцевина диаметром 40-45 нм имеет гексагональную форму и состоит из 3-х белков (VP1, VP2 и VP3) и РНК. Внутренний капсид (диаметр 15-20 нм) имеет икосаэдрическую форму и построен из 260 морфологических единиц, каждая из которых представлена белком VP6.  
50 Наружный капсид представлен белком VP7. На поверхности наружного капсида расположены "шипики", представленные димером белка VP4.

Антигенные свойства

Антиген ротавируса КРС штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП индуцирует в организме иммунизированных морских свинок и кроликов образование вирусспецифических антител, выявляемых в реакции диффузионной преципитации (РДП) в разведениях от 1:32 до 1:128 и от 1:32 до 1:256 соответственно. В иммуноферментном анализе (ИФА) сыворотки

5 положительно реагировали в разведении от 1:128 до 1:2048, в реакции связывания комплемента (РСК) - от 1:40 до 1:160.

В сыворотках крови глубокостельных коров через 10 дней после второй вакцинации антитела к ротавирусу в ИФА выявляли в титрах  $8,5-10,5 \log_2$  и  $10,6-14,0 \log_2$  в молозиве. Скармливание такого молозива обеспечивает высокий уровень колостральных антител

10 ( $7,0-8,5 \log_2$ ) в организме телят.

Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП обладает широким антигенным спектром и доминантностью. Средний показатель двустороннего антигенного родства (R%) предлагаемого штамма в РН с 12 эталонными и эпизоотическими штаммами ротавируса КРС составил 56,3%. Результаты исследований представлены в таблице 1.

15 Как свидетельствуют данные таблицы 1, штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП доминирует над изученными возбудителями ротавирусной инфекции КРС.

Биотехнологическая характеристика

Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС предназначен для изготовления инактивированных вакцин против ротавирусной инфекции КРС, диагностических антигенов

20 и сывороток, а также лечебных препаратов антител, из желтков яиц кур, иммунизированных вирусом КРС.

Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС проявляет высокую биологическую, антигенную и иммуногенную активность как в нативном виде, так и после инактивации, обладает широким антигенным спектром и доминантностью по отношению к полевым

25 штаммам.

Вирус штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП репродуцируется в монослойных перевиваемых культурах клеток MDBK, СПЭВ, ПСГК-30, Vero, Marc-145, КСТ и в течение 24-48 часов инкубирования накапливается в титрах  $5,5-7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ . Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС сохраняет исходные биологические свойства при пассировании в

30 культурах клеток.

Устойчивость к внешним факторам

Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС устойчив к хлороформу, фреону, эфиру, кислотой ( $\text{pH} \geq 4,0$ ) и щелочной среде ( $\text{pH} 8,0$ ). Возбудитель устойчив к воздействию трипсина.

Инактивированный ротавирус КРС штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП устойчив в процессе хранения при  $4^\circ\text{C}$  как в нативном состоянии, так и в составе инактивированной сорбированной вакцины.

35

Дополнительные признаки и свойства

Антигенная активность - обладает антигенностью в составе инактивированной вакцины и препарата для гипериммунизации доноров диагностических сывороток и антительных

40 лечебных препаратов.

Реактогенность - реактогенными свойствами не обладает.

Стабильность - сохраняет исходные биологические (антигенные) свойства при пассировании в культурах клеток в течение 20 пассажей.

Исходя из полученных данных, можно утверждать, что штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП по антигенному и иммунологическому спектрам является оригинальным, в таксономическом отношении новым, ранее неизвестным штаммом.

45

Использование диагностикумов, вакцины и препарата антител из желтков яиц кур, гипериммунизированных ротавирусом КРС, обеспечивает высокую эффективность мер борьбы с ротавирусной инфекцией КРС.

50 По мнению заявителя, предлагаемый штамм соответствует условиям патентоспособности "новизна" и "изобретательский уровень".

Сущность предлагаемого изобретения пояснена примерами его использования.

Пример 1

Получение штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС в культуре клеток MDBK  
Штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса крупного рогатого скота был изолирован из  
пробы фекалий от новорожденного теленка с нарушением функции желудочно-кишечного  
тракта. При изоляции возбудителя был использован комплекс вирусологических методов,  
5 изложенных в "Руководстве по индикации возбудителей особо опасных болезней  
сельскохозяйственных животных в объектах ветнадзора", утвержденном ГУВ ГАПК СССР  
15 марта 1990 г.

С этой целью суспензию фекалий пропускали через фильтр ФПП-15-1,5. Сорбированный  
ротавирус элюировали смесью, состоящей из равных частей хлороформа и раствора  
10 Хенкса. Объем элюата составлял 1/100-1/200 объема суспензии фекалий. В очищенный  
элюат добавляли антибиотики, выдерживали при 37°C 2-4 часа. К суспензии добавляли  
трипсин до концентрации 15-20 мкг/см<sup>3</sup> и термостатировали при 37°C в течение 30 минут.  
Перед заражением культуру клеток MDBK дважды отмывали от ростовой сыворотки  
раствором Хенкса. После заражения в культуру клеток MDBK вносили поддерживающую  
15 питательную среду, содержащую трипсин в концентрации 10-15 мкг/см<sup>3</sup>. Сосуды  
инкубировали при 37°C до появления изменений в клетках. Полученную вирусосодержащую  
суспензию замораживали - оттаивали и использовали для последующих пассажей. После 9  
пассажей в культуре клеток MDBK штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС обладал  
20 следующими характеристиками: титр инфекционности 7,5-8,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, активность в  
ИФА 7,0-8,5 log<sub>2</sub>.

#### Пример 2

Изучение адаптационных свойств штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС

Применение трипсина для предобработки штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС  
перед заражением, а также в процессе его репродукции, позволило значительно расширить  
25 круг чувствительных к нему перевиваемых культур клеток, в том числе и гетерологичных.  
Заражение культур клеток проводили 9 пассажем штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса  
КРС (в MDBK). Результаты приведены в таблице 2.

#### Пример 3

Получение и испытание диагностических антигенов и сывороток

Для получения антигена из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС исходную  
вирусосодержащую суспензию трижды замораживают-оттаивают. После этого  
вирусосодержащую жидкость осветляют низкоскоростным центрифугированием в течение  
20-30 минут. Для получения диагностического антигена используют ротавирус,  
35 репродуцированный в культуре клеток СПЭВ, а антигена для иммунизации - в культуре  
клеток MDBK.

Инактивацию вируса проводят 6%-ным рабочим раствором аминоксилэтиленимина  
(АЭЭИ) в конечной концентрации 0,15% при 37°C в течение 24 часов.

Концентрирование антигена проводят добавлением в суспензию инактивированного  
40 вируса 50%-ного раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ) м.м 6000 до конечной концентрации 8-  
10% по сухому веществу. Смесь выдерживают в течение 16-18 часов при 4°C до  
формирования осадка. Осадок отделяют центрифугированием при 5000 об/мин в течение  
30-40 минут и ресуспендируют в растворе Хенкса, составляющем 1/100-1/300 от  
первоначального объема суспензии. Полученный препарат проверяют на активность и  
45 специфичность в РДП и в ИФА. Результаты исследований приведены в таблице 3.

Гипериммунизацию доноров проводят эмульсией, изготовленной смешиванием  
инактивированного антигена и минерального или синтетического масла с соответствующим  
эмульгатором.

Морским свинкам живой массой 0,4-0,5 кг эмульсию антигена вводят 3 раза через 21 и  
50 28 дней после первой инокуляции внутримышечно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>.

Через 10-15 дней после окончания гипериммунизации морских свинок обескровливают.  
Результаты исследования полученных сывороток представлены в таблице 4.

Кроликам живой массой 2,0-3,0 кг эмульсию антигена вводят три раза: в мякиши задних

конечностей, в подколенные лимфоузлы и внутримышечно. Весь цикл иммунизации составляет 30-38 дней.

Приведенные в таблицах 3, 4 и 5 данные характеризуют высокую антигенную активность штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС, а полученные способом, описанным в  
5 примере 3, диагностические антигены и сыворотки позволяют диагностировать болезни желудочно-кишечного тракта новорожденных телят.

#### Пример 4

##### Изготовление вакцины

Для получения сорбированной инактивированной вакцины против ротавирусной  
10 инфекции КРС вирусную суспензию из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП, хранившуюся при минус 20°C, размораживают и подогревают до 37°C. К суспензии добавляют трипсин до концентрации 15-20 мкг/см<sup>3</sup> и термостатируют при 37°C в течение 30 минут. Перед  
заражением культуру с качественным монослоем дважды отмывают от ростовой сыворотки  
раствором Хенкса. В культуральные сосуды вносят вирус, обработанный трипсином. Доза  
15 заражения должна составлять 0,1-1,0 ИЕ/клетку. После заражения в культуру клеток вносят поддерживающую питательную среду, содержащую трипсин в концентрации 10-15 мкг/см<sup>3</sup>. Сосуды инкубируют при 37°C до появления ЦПД вируса более чем в 90% клеток  
20 монослоя (24-48 часов). Полученную вирусосодержащую суспензию замораживают-оттаивают. Охлажденную суспензию осветляют. Инактивацию вирусной суспензии проводят АЭИ в конечной концентрации 0,15% при 37°C в течение 24 часов.  
Инактивированный вирус проверяется на стерильность и авирулентность. К  
инактивированной суспензии добавляют стерильный 3%-ный коллоидный раствор гидроксида алюминия (ГОА). В качестве адъюванта используют сапонин из расчета 2,0 мг  
25 на дозу вакцины.

Полученный препарат контролируют на стерильность, безвредность и антигенную активность.

В таблицах 6-10 приведены результаты испытаний антигенной активности полученной  
30 вакцины на морских свинках, кроликах и глубокостельных коровах, свидетельствующие о высокой эффективности препарата.

Применение вакцины с такой характеристикой позволяет профилактировать ротавирусную инфекцию КРС и предотвращать заболевание и гибель новорожденных телят. Эффективность вакцинации составляет 95,5%.

#### Пример 5

Получение и испытание препаратов антител из желтков яиц кур, иммунизированных  
35 антигеном ротавируса КРС, штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП

Получение антигена. Для иммунизации кур используют производственный штамм №101  
ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса крупного рогатого скота, выделенный от больных телят. Вирус  
выращивают в перевиваемой культуре клеток MDBK в среде Игла, содержащей 10-15  
40 мкг/см<sup>3</sup> трипсина. Для концентрирования используют ротавирус с титром не ниже 7,0 Ig ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Вирусосодержащую суспензию осветляют низкоскоростным центрифугированием и обрабатывают ПЭГ м.м. 6000 до конечной концентрации 8-10% по сухому веществу.  
Активность антигена определяют в иммуноферментном анализе.

Определение активности антигена в ИФА. Лунки панели (фирмы "Nunc")  
45 сенсibiliзируют специфическими иммуноглобулинами в рабочем разведении в 0,015 М карбонатном буфере (18 ч, 4°C). Отмывку панели после этой и последующих стадий проводят 0,85%-ным физраствором, содержащим 0,05% Твин-20. Для блокирования оставшихся свободными сорбционных центров используют 1% раствор БСА на ФБР или 10% раствор фетальной сыворотки КРС (1 ч, 37°C). После промывки в лунки панели вносят  
50 исследуемые пробы антигена ротавируса в разведениях, а также положительные и отрицательные контроли (1-2 ч, 37°C). На следующем этапе добавляют антиротавирусный пероксидазный конъюгат (Москва, ВИЭВ) в рабочем разведении (1 ч, при 37°C). В качестве субстрата используют ортофенилендиамин (0,4 мг/см<sup>3</sup> ОФД в цитратно-

фосфатном буфере, pH 4,9-5,0 и 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Учет реакции проводят через 10-15 мин визуально или спектрофотометрически ( $\lambda=490$  нм). Для иммунизации кур используют антиген с активностью в ИФА в разведении не менее 1:1000-3000.

5 30 голов 20-22-недельных кур-несушек породы белый леггорн дважды иммунизируют (с интервалом в 4 недели) внутримышечно в области шеи антигеном ротавируса, эмульгированным в масляном адъюванте Montanide ISA-70. Иммунный ответ кур на введение антигена контролируют по наличию вирусспецифических антител в сыворотке крови и желтках яиц в РДП и ИФА. Пробы крови отбирают до иммунизации кур и через 7, 14 и 21 день после каждой иммунизации. Сыворотки крови хранят при -20°C.

10 Яйца от иммунизированных кур собирают ежедневно. Выделение глобулинов из желтков куриных яиц проводят следующим образом: желтки отделяют от белков, суспендируют в фосфатном буфере (0,01 М ФБР, pH 7,4, содержащий 0,1М NaCl), добавляют ПЭГ м.м. 6000 до конечной концентрации 3,5% и центрифугируют при 6000 об/мин в течение 60 мин. К надосадочной жидкости добавляют ПЭГ м.м. 6000 до концентрации 12% и центрифугируют в том же режиме. Осадок (IgY) очищают переосаждением 12% ПЭГ м.м. 6000. Образцы глобулинов хранят при -20°C.

Исследование сывороток кур (глобулинов) в ИФА. Сенсibiliзацию планшетов проводят антигеном ротавируса в рабочем разведении в 0,015 М Na-карбонатном буфере (18 ч, 4°C). После промывки панели в лунки вносят по 0,2 см<sup>3</sup> контрольных (положительной и отрицательной) и исследуемых сывороток (глобулинов) в разведении 1:25 (1:45) и титруют их последовательно двукратным шагом. После инкубации (2 ч, при 37°C) вносят препарат меченных пероксидазой иммуноглобулинов козы против IgG курицы (Москва, НИИ им. Гамалеи), затем субстрат ОФД.

Исследование сывороток кур (глобулинов) в РДП. Расплавленный на водяной бане агар ("Difco") разливают по 25 см<sup>3</sup> в чашки Петри с диаметром 9 см или на стеклянные пластинки размером 9x4 см. В застывшей агаровой пластинке штампами делают лунки по шестиугольной системе, в которой одна лунка расположена в центре, а шесть - вокруг. Диаметр каждой лунки 5 мм, расстояние между ними 5 мм. В центральную лунку вносят антиген, а в каждую пару периферических лунок - разведения сывороток (с 1:4 до 1:128) или глобулинов (с 1:32 до 1:1024). После постановки реакции агаровые пластинки выдерживают во влажной камере при 37°C. Реакцию учитывают через 16, 24, 48 и 72 ч после ее постановки. За предельный титр антител считают максимальное разведение испытуемой сыворотки (глобулина), с которым наблюдается положительная реакция. Результаты исследований представлены в таблице 11.

В желтках яиц кур антитела к ротавирусу КРС были обнаружены через 2 недели после первой иммунизации с титрами 2 log<sub>2</sub> в РДП, 3-4 log<sub>2</sub> в ИФА. После второй иммунизации уровень антител увеличивается до 4,0 log<sub>2</sub> (РДП) и 6,0 log<sub>2</sub> (ИФА). В последующие 4 недели титры антител повышаются и достигают 6,0-7,0 log<sub>2</sub> и 10,0 log<sub>2</sub> соответственно. Максимальное количество специфических антител было выявлено через 14 недель после второй иммунизации в титре 12,85 log<sub>2</sub> в ИФА. Высокий уровень антител наблюдали на протяжении 7 месяцев. В течение последующих 2 месяцев происходило плавное снижение количества ротавирусных антител до 6,5 log<sub>2</sub> в ИФА.

В сыворотках крови иммунизированных кур антитела к ротавирусу КРС были выявлены на 14 день после второй иммунизации в титрах: 5,0-6,0 log<sub>2</sub> в РДП и 9,65 log<sub>2</sub> в ИФА.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в желтках яиц кур антитела к ротавирусу КРС появляются в более ранний период (через 2 недели после первой иммунизации), чем в крови иммунизированных кур-несушек. Титры антител в желтках яиц выше и сохраняют высокий уровень на протяжении длительного периода после иммунизации. Наряду с этим выделенные из желтков иммуноглобулины обладают высокой специфичностью.

На основании этого была изучена возможность использования желтков яиц для специфического лечения новорожденных телят. С этой целью в хозяйстве,

неблагополучном по ротавирусной инфекции КРС, были подобраны две группы по 20 голов больных диареей 1-5-дневных телят. Каждому больному теленку опытной группы ежедневно добавляли в молозиво при утреннем и вечернем кормлении по одному яйцу. Курс лечения продолжался в течение 3-5 дней до полного выздоровления животного.

5 Таким образом, каждой голове задавали по 6-10 яиц с титром антител к ротавирусу 10,0-11,0 log<sub>2</sub> в ИФА.

Диарею у телят контрольной группы лечили по традиционной схеме с применением антибиотиков, нитрофуранов и сульфаниламидов. Терапевтический эффект в опытной группе составил 70% при 40% эффективности в контроле. Результаты исследований  
10 приведены в таблице 12.

Таким образом, иммунизация кур-несушек антигеном ротавируса КРС приводит к появлению в желтках яиц специфических антител и сохранению их высокого уровня на протяжении длительного периода.

Оральное введение специфических антител яичного желтка защищало новорожденных  
15 телят от диареи, вызванной ротавирусом КРС. При сопоставлении экономичности двух способов лечения телят расчеты показали, что себестоимость традиционного метода лечения превышает затраты предлагаемого в 9,75 раз.

Выделенные из желтков яиц иммунизированных кур иммуноглобулины обладали  
20 высокой активностью и специфичностью, что позволяет использовать их в диагностических целях, а также для технологического контроля вирусного сырья при изготовлении инактивированных вакцин.

Приведенная выше информация свидетельствует о выполнении при использовании предлагаемого изобретения следующей совокупности условий:

- штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП ротавируса КРС, воплощающий предлагаемое  
25 изобретение, предназначен для использования в сельском хозяйстве, а именно в ветеринарной вирусологии и биотехнологии;

- для предлагаемого изобретения в том виде, как оно охарактеризовано в формуле изобретения, подтверждена возможность его осуществления с помощью описанных в заявке или известных до даты приоритета средств и методов;

30 - штамм №101 ВНИИЗЖ-ДЕП, полученный в соответствии с предлагаемым изобретением, обладает высокой биологической, антигенной и иммуногенной активностью и пригоден для изготовления вакцинных, диагностических и лечебных препаратов против ротавирусной инфекции КРС.

Следовательно, предлагаемое изобретение соответствует условию  
35 патентноспособности "промышленная применимость".

Источники информации

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я. и др. Вирусные болезни животных. - М., ВНИТИБП, 1998. - С.43-54.

2. Mebus C.A., Underdahl N.R., Rhodes M.B., Twiehaus M. J. Calf diarrhea (scour):  
40 reproduced with a virus from a field outbreak. University of Nebraska College of Agric.and Home Econ., Res.Bull., 1969. -V.233. - P.1-16 (прототип).

3. Mebus C.A. et al. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by reolike virus //Vet.Pathol., 1971. - V.8. - P.490-505.

4. Derbyshire B., Woode G.N. Classification of rotaviruses: report from the World  
45 Health Organisation/Food and Agriculture Organisation Comparative Virology Program //J.Am.Med.Assoc., 1978.-V.173, N5, Pt 3. - P.123-125.

5. Сергеев В.А. Вирусные вакцины. Киев, "Урожай", 1993. - С.77-82.

6. Пат.США №3838004, 195-1.3, 24.09.74 г.

7. Пат.США №3839556, 424-89, 01.10.74 г.

50 8. Пат.США №3869547, 424-89, 04.03.75 г.

9. Пат.США №3873422, 195-1.3, 25.03.75 г.

10. Пат.США №3914408, 424-89, 21.10.75 г.

11. Пат.США №3919413, 424-89, 11.11.75 г.

12. Пат.США №3925544, 424-89, 09.12.75 г.

13. Kurogi H., Inaba V. et al. Cytopathic effect of Nebraska calf diarrhea virus (Lincoln strain) on secondary bovine kidney cell monolayers //Nat.Inst. Anim.Helath.-Quart (Tokyo) - 1976. - V.16, N3. - P.33-34.

5 14. Kuroki M., Ohta M. et al. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk //Arch.Virol, 1994, N117. - P.143-148.

15. Гоголев М.М., Матюшина Н.И. и др. Репродукция и индикация ротавируса крупного рогатого скота. Бюл.ВИЭВ, 1983. - Вып.49. - С.49-52.

10 16. Скибицкий В.Г., Собко Ю.А. Электронномикроскопическое изучение ротавируса крупного рогатого скота (штамм Тиверваль), репродуцированного в гетерологической системе клеток //Тез.докл.Республ.науч.-техн.конф. "Ветеринарные проблемы промышл.животноводства" (17-19 октября, 1985 г., г.Белая Церковь). -Белая Церковь, 1985. - Ч.1. - С.74-75.

15 17. Скибицкий В.Г., Миськевич С.В. и др. Культивирование ротавирусов SA11 и Тиверваль в перевиваемой культуре клеток СПЭВ для получения диагностикумов //Тез.докл.Республ.науч.-техн.конф. "Ветеринарные проблемы промышл. животноводства" (17-19 октября, 1985 г., г.Белая Церковь). - Белая Церковь, 1985. - Ч.1.- С.75-76.

18. Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M. et al. Further studies on passive immunization of newborn calves against rotaviral infection

20 //Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis., 1989.- V.12, N3.- P.71-76.

19. Пат.РФ №2095083, А 61 К 39/15, 10.11.97 г.

20. Пат.Японии №2950273 В2; А 61 К 39/15, А 61 К 31/00; 20.09.99 г.

25

30

35

| №№ п/п | Наименование штаммов ротавируса | Среднее (R%) антигенное родство изучаемых штаммов |
|--------|---------------------------------|---|
| 1.     | Тиверваль                       | 31,6  |
| 2.     | Линкольн                        | 44,5  |
| 3.     | SA-11                           | 12,5  |
| 4.     | №101                            | 56,3  |
| 5.     | З                               | 21,3  |
| 6.     | ЛА                              | 31,6  |
| 7.     | В                               | 26,7  |
| 8.     | С                               | 22,7  |
| 9.     | ВО                              | 28,8  |
| 10.    | К                               | 26,0  |
| 11.    | П                               | 30,7  |
| 12.    | Д                               | 32,8  |
| 13.    | Б                               | 29,6  |

40

45

| Культура клеток | Время репродукции, час. | Инфекционная активность, lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> | Титр в ИФА, log <sub>2</sub> |
|-----------------|-------------------------|--|------------------------------|
| СПЭВ            | 24-30                   | 7,0-7,5  | 7,0-7,5                      |
| ПСГК-30         | 24-30                   | 6,0-6,5  | 5,0-5,5                      |
| Vero            | 48                      | 5,5-6,0  | 6,0-6,5                      |
| Марс-145        | 24                      | 6,0-6,5  | 6,0-6,5                      |
| КСТ             | 48                      | 6,0  | 5,0-6,0                      |
| ПТ              | 48-72                   | 3,0-4,0  | 3,0-4,0                      |

50

| №№ п/п | Кратность концентрирования антигена | Титр антител, log <sub>2</sub> |     |
|--------|-------------------------------------|--------------------------------|-----|
|        |                                     | РДП                            | ИФА |
| 1      | 300                                 | 32                             | 405 |
| 2      | 100                                 | 16                             | 135 |
| 3      | 300                                 | 32                             | 405 |
| 4      | 300                                 | 32                             | 405 |

|    |    |                                       |     |      |
|----|----|---------------------------------------|-----|------|
|    | 5  | 100                                   | 32  | 1215 |
|    | 6  | 100                                   | 8   | н/и  |
|    | 7  | 100                                   | 16  | 405  |
|    | 8  | 50                                    | 25  | 1215 |
| 5  | 9  | 100 (с последующей ультрафильтрацией) | 64  | 1215 |
|    | 10 | 100                                   | 32  | 405  |
|    | 11 | 200                                   | 128 | 3000 |
|    | 12 | 7                                     | н/и | 1215 |
|    | 13 | 200                                   | 128 | 3000 |
|    | 14 | 200                                   | 128 | 1215 |
| 10 | 15 | 240                                   | 128 | 3645 |

Примечание: Активность антигена указана в показателях, обратных разведению. н/и - не исследовали.

Таблица 4  
Активность сывороток морских свинок, гипериммунизированных ротавирусом КРС штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП

| Серия | Титр антител, log <sub>2</sub> |             |          |
|-------|--------------------------------|-------------|----------|
|       | РДП                            | ИФА         | РСК      |
| 1     | 5,54±0,201                     | 11,03±0,156 | 5,33±0,2 |
| 2     | 5,91±0,076                     | 11,84±0,204 | 6,33±0,3 |
| 3     | 5,37±0,321                     | 11,32±0,059 | 7,33±0,4 |

Таблица 5  
Активность сывороток кроликов, гипериммунизированных ротавирусом КРС штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП

| Серия | Титр антител, log <sub>2</sub> |             |
|-------|--------------------------------|-------------|
|       | РДП                            | ИФА         |
| 1     | 5,73±0,065                     | 10,43±0,402 |
| 2     | 5,64±0,024                     | 10,82±0,153 |
| 3     | 5,49±0,121                     | 10,71±0,127 |

Таблица 6  
Антигенная активность вакцины против ротавирусной инфекции КРС сорбированной инактивированной из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП

| №№ п/п | №№ серии | Средние титры антител (log <sub>2</sub> ) в РДП к ротавирусу КРС в сыворотках крови вакцинированных |           |
|--------|----------|---|-----------|
|        |          | морских свинок  | кроликов  |
| 1      | 1        | 5,33±0,79   | 4,85±0,72 |
| 2      | 6        | 5,10±0,77   | 6,32±0,69 |
| 3      | 9        | 5,95±0,72   | 4,80±0,76 |
| 4      | 10       | 5,33±0,81   | 8,20±0,90 |
| 35     | 11       | 5,23±0,78   | 4,65±0,75 |
| 5      | 12       | 6,50±0,76   | 6,50±0,81 |
| 6      | 13       | 6,20±0,83   | 6,30±0,70 |
| 7      | 14       | 5,70±0,69   | 5,90±0,51 |
| 8      | 15       | 4,80±0,75   | 6,70±0,47 |
| 40     | Среднее  | 5,57±0,80   | 6,03±0,74 |

Таблица 7  
Изучение сохраняемости при 4-8°С иммуногенной активности вакцины против ротавирусной инфекции КРС сорбированной инактивированной из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП

| №№ п/п | №№ серии | Срок хранения, мес. | ИмД <sub>50</sub>  |                |
|--------|----------|---------------------|--------------------|----------------|
|        |          |                     | после изготовления | после хранения |
| 1      | 2        | 9                   | 0,080              | 0,082          |
| 2      | 3        | 10                  | 0,079              | 0,090          |
| 3      | 4        | 9                   | 0,080              | 0,087          |
| 4      | 5        | 9                   | 0,080              | 0,085          |
| 5      | 6        | 14                  | 0,068              | 0,091          |
| 50     | 6        | 6                   | 0,045              | 0,049          |
| 7      | 12       | 13                  | 0,06               | 0,084          |

Таблица 8  
Изучение сохраняемости при 4-8°C иммуногенной активности ротавирусного антигена из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП в вакцине против рота- и коронавирусной инфекций КРС сорбированной инактивированной

| №№ п/п  | №№ серии | Срок хранения, мес. | ИмД <sub>50</sub>  |                |
|---------|----------|---------------------|--------------------|----------------|
|         |          |                     | после изготовления | после хранения |
| 1       | 1        | 6                   | 0,054              | 0,050          |
| 2       | 2        | 8                   | 0,061              | 0,065          |
| 3       | 4        | 7                   | 0,018              | 0,020          |
| 4       | 5        | 7                   | 0,020              | 0,020          |
| 5       | 6        | 8                   | 0,059              | 0,061          |
| 6       | 7        | 6                   | 0,050              | 0,059          |
| 7       | 8        | 6                   | 0,070              | 0,072          |
| 8       | 9        | 7                   | 0,065              | 0,070          |
| 9       | 10       | 4                   | 0,049              | 0,050          |
| 10      | 12       | 4                   | 0,050              | 0,052          |
| Среднее |          |                     | 0,050              | 0,052          |

Таблица 9  
Результаты исследования в РДП сывороток крови кроликов, привитых ассоциированными вакцинами

| №№ п/п | Кол-во серий | Антигенный состав вакцины  | Средний титр антител к ротавирусу, log <sub>2</sub> |
|--------|--------------|----------------------------|---|
| 1      | 7            | Рота- и коронавирусы       | 5,0±,57   |
| 2      | 3            | Рота-, корона- и реовирусы | 6,05±0,46   |

Таблица 10  
Результаты испытания антигенной активности вакцины против ротавирусной инфекции КРС сорбированной инактивированной из штамма №101 ВНИИЗЖ-ДЕП на глубококостельных коровах

| №№ п/п | Характеристика сыворотки                                     | кол-во проб | Титр антител в ИФА, log <sub>2</sub> |
|--------|--|-------------|--------------------------------------|
| 1      | Кровь взята до вакцинации                                    | 10          | 5,2±0,88                             |
| 2      | Кровь взята от вакцинированных коров за 18 дней до отела     | 10          | 8,1±0,77                             |
| 3      | Кровь взята от вакцинированных коров за 7 дней до отела      | 10          | 10,8±0,37                            |
| 4      | Молозиво от вакцинированных коров, отобранное после отела в: | 1-й день    | 13,0±0,71                            |
|        |  | 2-й день    | 11,6±0,51                            |
|        |  | 3-й день    | 10,6±0,43                            |

Таблица 11  
Титр антител к ротавирусу КРС в сыворотках крови и желтках яиц гипериммунизированных кур

| Проба               | Титр антител, log <sub>2</sub> |            |
|---------------------|--------------------------------|------------|
|                     | РДП                            | ИФА        |
| Сыворотка крови кур | до иммунизации                 | -          |
|                     | после 1 иммунизации            | 4,22±0,321 |
|                     | после 2 иммунизации            | 4,44±0,013 |
| Желтки яиц          | до иммунизации                 | -          |
|                     | после 1 иммунизации            | 5,51±0,130 |
|                     | после 2 иммунизации            | 6,47±0,019 |

Таблица 12  
Сравнительная оценка методов лечения диарей новорожденных телят

| Наименование препарата                                | Кол-во живых | Возраст (дни) | Терапевтический эффект, (%) | Стоимость курса лечения, в руб. |
|---|--------------|---------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Яичный желток от иммунизированных ротавирусом КРС кур | 20           | 1-5           | 70                          | 8                               |
| Традиционные методы лечения (контроль)                | 20           | 1-5           | 40                          | 78                              |

Формула изобретения

Штамм Rotavirus крупного рогатого скота, сем. Reoviridae, род Rotavirus, коллекция ВГНКИ №101 ВНИИЗЖ-ДЕП, для изготовления диагностических, вакцинных и лечебных

препаратов.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50