



MD 1899 F1 2002.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1899 (13) F1
(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 35/78, 38/01

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: a 2000 0189 (22) Data depozit: 2000.10.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2002.04.30, BOPI nr. 4/2002
(71) Solicitanți: EREMIA Nicolai, MD; CRASOCICO Petru, BY	
(72) Inventatori: EREMIA Nicolai, MD; CRASOCICO Petru, BY; PRUDNICOV Victor, BY; MIHAILOVA Angelica, BY	
(73) Titulari: EREMIA Nicolai, MD; CRASOCICO Petru, BY	

(54) Metodă de stimulare a imunității postvaccinale contra ciumei la animalele
carnivore

(57) Rezumat:

1
 Invenția se referă la imunologia veterinară, în special la o metodă de stimulare a imunității postvaccinale contra ciumei la animalele carnivore.
 Metoda de stimulare a imunității postvaccinale contra ciumei la animalele carnivore constă în imunizarea animalelor cu vaccin din tulpina ЭПМ cu titrul 5,0 lg TCD_{50/ml} împreună cu un imunostimulator. În calitate de imunostimulator se folosește hidrolizatul alcalin al păsturii în doză de 20...25 mg/cap. Animalele sunt imunizate la vârsta de 7...8 luni o singură dată intramuscular.

2
 5 Rezultatul invenției constă în majorarea activității indicilor principali ai imunității humorale și celulare, care contribuie la crearea unei imunități mai intense și de lungă durată contra ciumei la carnivore.
 10 Revendicări: 1

15

MD 1899 F1 2002.04.30

MD 1899 F1 2002.04.30

3

Descriere:

Invenția se referă la imunologia veterinară, în special la metoda de stimulare a imunității post-vaccinale la animalele cu maladii infecțioase.

5 Este cunoscută metoda de profilaxie a ciumei animalelor carnivore cu ajutorul imunizării lor cu vaccină de virusuri împotriva acestei infecții [1].

Dezavantajul acestei metode constă în eficacitatea insuficientă la producerea imunității post-vaccinale condiționat de efectuarea imunizării animalelor în ambianța deprimării sistemului imun, provocat de stres, dezechilibrarea metabolismului albuminelor, schimbului substanțelor minerale și factorii ecologici.

10 Este cunoscută metoda de stimulare a imunității post-vaccinale la animale cu ajutorul prodigiozanului (lipopolizaharidul bacterial, căpătat din *Bacterium prodighiosum*) [2].

Însă dezavantajul ei constă în reactogenitatea înaltă, în același timp introducerea preparatului cu vaccină determină sensibilitatea organismului antigenelor bacteriene, care reprezintă gazda tubului digestiv la animale.

Cea mai apropiată soluție de cea declarată este metoda stimulării imunității cu ajutorul preparatului ribotan, care prezintă o sare a acidului ribonucleic al bacteriilor.

15 Animalele se vaccinează cu vaccină culturală uscată vie împotriva ciumei la animalele carnivore ЭИМ cu titrul virusului infecțios 5,0 lg TCD_{50/ml} în doză de 1 ml, concomitent cu imunostimulatorul ribotan [3].

Dezavantajul ei constă în aceea că preparatul activează imunitatea nespecifică și nu contribuie la producerea imunității împotriva ciumei la animalele carnivore.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea metodei activizării imunității post-vaccinale împotriva ciumei la animalele carnivore, cu folosirea stimulatorului nespecific al sistemului imun - remediul din păstură apicolă Apistimulina-A.

25 Problema pusă poate fi rezolvată prin aceea că pentru stimularea imunității post-vaccinale împotriva ciumei la animalele carnivore se folosește metoda în care vaccina împotriva ciumei la animalele carnivore se administrează concomitent cu hidrolizatul alcalin al păsturii din calculul la o doză (1 ml) de vaccină culturală uscată vie împotriva ciumei ЭИМ cu titrul infecțios al virusului 5,0 lg TCD_{50/ml}, remediul din păstură Apistimulina-A în cantitate de 20-25 mg/cap. Imunizarea se efectuează o singură dată intramuscular în partea interioară a coapsei.

Remediul pentru stimularea imunității post-vaccinale se obține din produs pur ecologic - păstură apicolă.

30 Remediul - hidrolizatul alcalin al păsturii nu posedă efecte alergice, toxice, dar în același timp activează imunoglobulinele, sistemele limfocitare T și B, activitatea fagocitară a neutrofilelor, mărește titrul interferonului, majorează activitatea lizozimei și activitatea bactericidă a serului sanguin [4, 5, 6, 7].

35 Esența invenției constă în faptul că metoda de stimulare a imunității post-vaccinale la animalele carnivore cu ciumă în care virus-vaccina culturală uscată vie împotriva ciumei se administrează concomitent cu imunostimulatorul - hidrolizatul păsturii, în cantitate 20-25 mg/cap. Imunizarea se efectuează o singură dată intramuscular în partea interioară a coapsei.

40 Rezultatul invenției constă în activizarea indicilor principali ai imunității humorale și celulare cu 50-100%. În special, se mărește titrul anticorpilor, se activează biosinteza anticorpilor împotriva virusurilor, crește activitatea bacteriană, lizozimică, fagocitară, indexul fagocitar, ceea ce duce la intensitatea mai majoră a imunității împotriva ciumei, care face posibil ca organismul mult mai ușor să se lupte cu infecția virală și să fie mai rezistent la această maladie.

45 *Exemplul 1.* Imunizarea cățelușilor de vulpe argintii-negri împotriva ciumei s-a efectuat la vârsta de 7-8 luni prin administrarea vaccinei uscate vie ЭИМ cu titrul infecțios al virusului 5,0 lg TCD_{50/ml} în doză de 1 ml concomitent cu imunostimulatorul - hidrolizatul alcalin al păsturii (Apistimulina-A) în cantitate de 20-25 ml/cap. Vaccina uscată vie se dizolvă în soluție fiziologică, apoi se adaugă hidrolizatul alcalin al păsturii. Vaccina cu imunostimulatorul s-a introdus o singură dată intramuscular în partea interioară a coapsei.

Exemplul 2. Pentru prelucrarea dozei optime de hidrolizat alcalin al păsturii (Apistimulina-A) s-au folosit 20 de cățeluși de vulpe argintii-negri. Cățelușii de vulpe argintii-negri au fost repartizați câte 5 în 4 loturi.

50 Cățelușilor lotului I li s-a introdus vaccina pură împotriva ciumei ЭИМ cu titrul infecțios al virusului 5,0 lg TCD_{50/ml}, cățelușilor lotului II aceeași doză de vaccină cu hidrolizatul alcalin al păsturii în cantitate de 20 mg/cap, la lotul III - vaccină cu hidrolizatul alcalin al păsturii în cantitate de 25 mg/cap, la lotul IV - vaccină cu hidrolizatul alcalin al păsturii în cantitate de 30 mg/cap.

Pentru cercetări de la acești cățeluși s-au prelevat 3 probe de sânge: până la imunizare, peste 3 și peste 14 zile după. În sângele animalelor s-a determinat titrul anticorpilor la virusul ciumei și indicii principali.

55 În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele obținute la prelucrarea dozelor optime de Apistimulina-A pentru imunizare împotriva ciumei.

MD 1899 F1 2002.04.30

Tabelul 1

Nr. d/o	Sângele prelevat	Titrul anticorpilor în sângele cățelușilor de vulpe din diferite loturi (\log_2)			
		Lotul I (ЭИМ)	Lotul II (ЭИМ+ Apistimulina-A, 20 mg/cap)	Lotul III (ЭИМ+ Apistimulina-A, 25 mg/cap)	Lotul IV (ЭИМ+ Apistimulina-A, 30 mg/cap)
1.	Până la imunizare	0	0	0	0
2.	Peste 3 zile	4,50±0,54	7,10±0,14	7,20±0,12	6,20±0,12
3.	Peste 14 zile	7,40±0,12	9,20±0,16	9,40±0,07	9,00±0,07

Din tabel se vede că doza optimă de Apistimulină-A la imunizare împotriva ciumei este de 20-25 mg/cap.

5 *Exemplul 3.* Pentru cercetarea influenței acțiunii remediei Apistimulina-A la constituirea imunității post-vaccinale la animalele carnivore cu ciună a fost efectuat un experiment cu cățelușii de vulpe argintii-negre. S-au folosit 20 de capete în vârstă de 7-8 luni, care au fost repartizați în 4 loturi câte 5 capete.

10 Cățelușii de vulpe din lotul experimental I au fost vaccinați cu vaccină culturală uscată vie împotriva ciumei ЭИМ cu titrul virusului infecțios 5,0 lg TCD_{50/ml}. Animalele din lotul II au fost vaccinați cu aceeași vaccină, iar pentru activizarea imunității s-a folosit imunostimulatorul ribotan. Lotul III a fost vaccinat cu aceeași vaccină, iar pentru activizarea imunității s-a folosit imunostimulatorul Apistimulină-A în doză de 25 mg la 1 ml/cap. Lotul IV a fost ca martor (în loc de vaccină și imunostimulatori s-a introdus soluție izotonică de clorură de sodiu).

15 Pentru cercetări a fost prelevat sânge până la prelucrare, peste 3, 14 și 90 de zile după. În sânge s-au studiat indicii principali ai imunității celulare (numărul leucocitelor, numărul fagocitar și indexul fagocitar) și humorale (activitatea bactericidă și lizozimică, activitatea serurilor sângelui, titrul anticorpilor la RNGA).

Pentru studierea imunității peste 15 zile după imunizare o parte din cățelușii de vulpe experimentali și martori au fost sacrificați. Pentru cercetările histologice și numărarea celulelor plasmactice s-au prelevat preparate de splină, noduri limfocitare regionale și contraregionale de locul introducerii vaccinii.

20 În tabelul 2 sunt prezentate rezultatele cercetării intensității imunității împotriva ciumei după imunizare cu vaccină pură și cu imunostimulatori.

Tabelul 2

Nr. d/o	Sângele prelevat	Titrul anticorpilor în sângele cățelușilor de vulpe din diferite loturi (\log_2)			
		Lotul I (ЭИМ)	Lotul II (ЭИМ+ribotan)	Lotul III (ЭИМ+Apistimulina-A)	Lotul IV (martor)
1.	Până la imunizare	0	0	0	0
2.	Peste 3 zile	4,50±0,54	6,90±0,41	7,20±0,12	0
3.	Peste 14 zile	7,40±0,12	8,10±0,16	9,40±0,07	0
4.	Peste 90 zile	5,70±0,33	6,20±0,92	7,80±0,46	0

25 Din rezultatele prezentate se vede că titrul anticorpilor la a 14-a zi după vaccinare cu vaccină și Apistimulină-A a alcătuit 9,4 \log_2 , atunci când la cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină pură - 7,4 \log_2 , iar la cei vaccinați cu vaccină și ribotan (cea mai apropiată soluție) - 8,1 \log_2 , ceea ce demonstrează că cel mai puternic activează biosinteza anticorpilor împotriva virusurilor vaccina administrată concomitent cu Apistimulina-A.

30 În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele cercetării dinamicii leucocitelor la cățelușii de vulpe argintii-negri după imunizare cu vaccină pură și vaccină cu imunostimulatori.

Tabelul 3

Nr. d/o	Sângele prelevat	Numărul leucocitelor ($\times 10^9$)		
		Lotul I (ЭИМ)	Lotul II (ЭИМ+ribotan)	Lotul III (ЭИМ+Apistimulină-A)
1.	Până la imunizare	5,30±0,46	5,40±1,18	5,30±0,14
2.	Peste 3 zile	6,70±1,72	6,90±1,19	8,60±1,72
3.	Peste 14 zile	10,20±1,18	11,60±1,34	13,30±0,18
4.	Peste 90 zile	5,20±0,91	5,20±01,08	6,40±01,35

35 Din tabel se vede că după a 14-a zi la cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină pură numărul leucocitelor a crescut de la $5,3 \times 10^9$ până la $10,2 \times 10^9$, la cei cu vaccină+ribotan - de la $5,4 \times 10^9$ până la $11,6 \times 10^9$, la animalele cu vaccină+Apistimulina-A - de la $5,3 \times 10^9$ până la $13,3 \times 10^9$. Aceasta demonstrează activizarea substanțială a imunității celulare la cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină+Apistimulină-A.

MD 1899 F1 2002.04.30

5

În tabelul 4 sunt prezentate rezultatele studierii activității bactericide în serurile de sânge la cățelușii de vulpe argintii-negri la imunizare împotriva ciumei animalelor carnivore cu folosirea imunostimulatorilor.

Tabelul 4

Nr. d/o	Sângele prelevat	Activitatea bactericidă, %		
		Lotul I (ЭИМ)	Lotul II (ЭИМ+ribotan)	Lotul III (ЭИМ+Apistimulină-A)
1.	Până la imunizare	27,78±0,19	26,54±0,22	27,12±0,08
2.	Peste 3 zile	38,47±3,07	42,81±2,18	46,42±2,06
3.	Peste 14 zile	41,25±1,52	48,49±1,43	95,63±2,56
4.	Peste 90 zile	31,63±0,77	37,65±2,45	50,47±2,32

5 Rezultatele căpătate demonstrează o activizare simțitoare a imunității nespecifice humorale la animale, mai ales la cele vaccinate cu vaccină și Apistimulina-A. Așadar peste 14 zile după imunizare activitatea bactericidă la cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină pură a crescut de la 27,78% la 41,25%, cu vaccină cu imunostimulator ribotan - de la 26,54% la 48,49% și cu vaccină+Apistimulină-A - de la 27,12% la 95,63%. Așa stare s-a continuat și peste 90 de zile de supraveghere.

10 Pe baza rezultatelor prezentate la studierea activității lizozimelor în serurile sanguine, ca unul din indicii principali ai imunității humorale nespecifice, se vede că după vaccinarea cățelușilor de vulpe argintii-negri cu imunostimulatori, ea se activează considerabil după a 3-a zi de supraveghere și mai deosebit peste 14 zile. Așadar la cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină vie peste 3 zile activitatea lizozimică a serului sanguin a crescut de la 7,3% la 7,6%, peste 14 zile până la 12,2%. La cățelușii de vulpe vaccinați cu vaccină și ribotan (soluția proximală) a crescut corespunzător cu 5,4%, 9,2% și 12,8%, cu Apistimulina-A - 5,3%, 16,6% și 26,5%. Peste 90 de zile activitatea lizozimică la cățelușii de vulpe puțin s-a redus, însă cu toate acestea la cei care au fost imunizați cu vaccină și Apistimulina-A acest indice a fost de 2 ori mai mare decât la cei imunizați cu vaccină pură (tab. 5).

Tabelul 5

Nr. d/o	Sângele prelevat	Activitatea lizozimică, %		
		Lotul I (ЭИМ)	Lotul II (ЭИМ+ribotan)	Lotul III (ЭИМ+Apistimulină-A)
1.	Până la imunizare	7,30±1,32	5,40±0,96	5,30±1,07
2.	Peste 3 zile	7,60±0,90	9,20±1,53	16,60±2,18
3.	Peste 14 zile	12,20±1,47	12,80±1,39	26,50±0,78
4.	Peste 90 zile	7,80±0,14	10,20±0,25	15,90±0,07

20 Vaccinarea animalelor carnivore împotriva ciumei activează nu numai imunitatea humorală, dar și cea celulară. În mod deosebit, s-au înregistrat schimbări caracteristice la studierea activității fagocitare a neutrofilelor și a reacției plasmocitare în organele imunizate.

25 Studiarea numărului fagocitar și a indexului fagocitar la cățelușii de vulpe argintii-negri imunizați cu vaccină împotriva ciumei a arătat că numărul fagocitar, mai precis numărul bacteriilor cotropite la numărul neutrofilelor active la cățelușii imunizați atât cu vaccină pură, cât și cu vaccină+ribotan peste 14 zile s-a mărit neînsemnat de la 3,2 la 3,6 și de la 2,8 la 3,8, respectiv, dar la folosirea vaccinei și Apistimulinei-A acest indice după a 3-a zi s-a ridicat de la 3,2 la 4,8, iar peste 14 zile până la 6,1.

30 Indexul fagocitar, adică raportul numărului bacteriilor cotropite către numărul total al neutrofilelor cercetate de asemenea avea deosebită esențială. Așadar, la cățelușii de vulpe imunizați cu vaccină pură și vaccină cu ribotan s-a observat o scădere a acestui indice după 14 zile corespunzător de la 3,2 la 1,9 și de la 2,8 la 2,2. Dar folosirea Apistimulinei-A cu vaccină stimulează fagocitoza - indexul fagocitar a crescut la 14 zile de la 2,8 la 5,4. Aceasta demonstrează că Apistimulina-A constituie un puternic activizator al imunității celulare la animale (tab. 6).

35 Caracteristica reacției plasmocitare s-a determinat după așa indici ca numărul plasmocitelor și numărul plasmoblastelor determinate în 50 de câmpuri de vedere ale microscopului (obiectivul 90^x, ocularul 7^x, binocularul 1,5^x).

40 Reacția plasmocitară ca indice imunologic al restructurării organismului, îndreptat la biosinteza anticorpilor împotriva virusurilor a arătat că la animalele imunizate cu vaccină pură peste 2 săptămâni după imunizare în splină numărul plasmoblastelor a alcătuit 6,2, plasmocitele - 22,2, în regiunea introducerii vaccinei nodul limfocitar - corespunzător 36,4 și 29,7, în locul contraregional nodul limfocitar - 12,6 și 19,4.

MD 1899 F1 2002.04.30

6

Cățelușii de vulpe argintii-negri, cărora li s-a administrat vaccină cu ribotan în splină au avut 10,3 plasmoblaste și 44,7 plasmocite, în nodul limfocitar regional - corespunzător 37,8 și 52,1, în nodul limfocitar contraregional - 15,5 și 38,3.

5 Cățelușii de vulpe imunizați cu vaccină și Apistimulină-A în splină aveau 9,4 plasmoblaste și 62,6 plasmocite, în nodul limfocitar regional - 25,3 și 74,8, în cel contraregional - 12,8 și 49,3 (tab. 7).

Acești indici demonstrează restructurarea imunologică considerabilă a organismului cățelușilor de vulpe, mai ales la imunizare cu vaccină și Apistimulină-A. Imunomorfogeneza este prevăzută pentru majorarea numărului celulelor precoce imunocompetente - plasmoblaste, ceea ce majorează nivelul de răspundere imunohumoral la imunizare.

10 Așadar, imunizarea cățelușilor de vulpe cu virus-vaccină împotriva ciumei animalelor carnivore concomitent cu Apistimulina-A permite activizarea cu 50-100% a indicilor principali ai imunității humorale și celulare, ceea ce duce la intensificarea imunității împotriva ciumei, și îi dă posibilitate organismului să se lupte cu infecția virotică și să fie mai rezistent la această maladie.

Tabelul 6

Nr. d/o	Sângele prelevat	Activitatea lizozimică, %							
		Lotul I (ЭИМ)		Lotul II (ЭИМ+ribotan)		Lotul III (ЭИМ+Apistimulina-A)		Lotul IV (martor)	
		Numărul fagocitar*	Indexul fagocitar**	Numărul fagocitar*	Indexul fagocitar**	Numărul fagocitar**	Indexul fagocitar**	Numărul fagocitar*	Indexul fagocitar**
1.	Până la imunizare	3,20±0,05	3,20±0,05	2,80±0,05	2,80±0,08	3,20±0,05	2,80±0,05	3,20±0,05	2,80±0,05
2.	Peste 3 zile	3,30±0,12	1,70±0,12	3,40±0,09	2,00±0,09	4,80±0,12	4,20±0,12	3,10±0,05	2,70±0,05
3.	Peste 14 zile	3,60±0,04	1,90±0,04	3,80±0,04	2,20±0,04	6,10±0,08	5,40±0,08	3,30±0,04	2,90±0,06
4.	Peste 90 zile	3,10±0,08	1,60±0,08	3,30±0,05	2,80±0,10	3,60±0,06	3,20±0,06	3,00±0,04	2,50±0,03

15

Notă:

* numărul fagocitar - numărul bacteriilor cotoprite la numărul neutrofilelor active;

** indexul fagocitar - raportul dintre numărul bacteriilor cotoprite către numărul total de neutrofile cercetate.

20

Tabelul 7

Nr. d/o	Organele sistemului imun	Reacția plasmocitară la cățelușii de vulpe în loturi*					
		Lotul I (ЭИМ)		Lotul II (ЭИМ+ribotan)		Lotul III (ЭИМ+Apistimulina-A)	
		plasmoblaste	plasmocite	plasmoblaste	plasmocite	plasmoblaste	plasmocite
1.	Splina	6,20±0,11	22,20±0,40	10,30±0,70	44,70±1,60	9,40±0,16	62,60±2,12
2.	Locul regional unde s-a introdus vaccina, nodul limfocitar (dreptul)	36,40±1,06	29,70±0,06	37,80±1,06	52,10±1,53	25,30±0,92	74,80±1,76
3.	Locul contraregional unde s-a introdus vaccina, nodul limfocitar (stângul)	12,60±0,38	19,40±0,97	15,50±1,67	38,30±1,19	12,80±0,04	49,30±2,62

Notă:

* numărul plasmocitelor și numărul plasmoblastelor determinate în 50 de câmpuri de vedere ale microscopului (obiectivul 90^x, ocularul 7^x, binocularul 1,5^x)

25

MD 1899 F1 2002.04.30

7

(57) Revendicare:

- 5 Metodă de stimulare a imunității postvaccinale contra ciumei la animalele carnivore, care include imunizarea animalelor cu vaccin din tulpina ЭПМ împreună cu un imunostimulator, **caracterizată prin aceea că** pentru imunizare se folosește vaccinul cu titrul 5,0 lg TCD_{50/ml}, în calitate de imunostimulator se folosește hidrolizatul alcalin al păsturii în doză de 20...25 mg /cap, iar imunizarea se efectuează la animale în vârstă de 7...8 luni o singură dată intramuscular.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Мурин В.Н. и др. Способ специфической профилактики чумы. Вирусные болезни животных. Москва, 1998, с. 268-283
2. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. Москва: Медицина, 1985, с. 416
3. Прудников В.С. и др. Методические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике чумы плотоядных. Витебск, 1999, стр. 22-25

Șef Secție:

CRASNOVA Nadejda

Examinator:

BANTAȘ Valentina

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria