

УДК: 619:615.371:616.98:579.842.14

## ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИСПЫТАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬГИРОВАННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Амосова Л.А., Ломако Ю.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск

*На основе структурных антигенов сальмонелл серовариантов *Sal. dublin*, *Sal. typhimurium* изготовлена вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота. Как показали исследования, препарат ареактогенен, безвреден для животных и стимулирует образование напряженного иммунитета, препятствующего заболеванию сальмонеллезом.*

*Vaccine inactivated emulsified made on the basis of structural antigens of *Sal. dublin*, *Sal. typhimurium* for the prevention of salmonellosis in cattle. Studies have shown that the vaccine is harmless to animals and stimulates the immunity that prevents disease of salmonellosis.*

**Введение.** В условиях повсеместного распространения и многолетней тенденции к росту заболеваемости сальмонеллезом, особую озабоченность вызывает несовершенство средств специфической профилактики, что объясняется полиэтиологичностью возбудителя, значительной вариабельностью антигенного состава, возможностью изменения эпизоотической ситуации за счет завоза новых сероваров сальмонелл [0].

Основой любой вакцины являются антигены, представленные бактериальными клетками либо их частями. Современным запросам иммунопрофилактики соответствуют вакцинные препараты, полностью лишенные балластных и токсических веществ, с химически определенным составом и структурой, и эффективными иммунизирующими свойствами [0].

Отдельная антигенная молекула часто не обладает иммуногенностью или обладает ей в небольшой степени. Для усиления иммунизирующего действия антигенов используется адсорбция молекул антигена на частицах суспензии минерального адъюванта или частицах эмульсии органического адъюванта. При этом отдельные молекулы оказываются собранными (агрегированными), что изменяет условия их взаимодействия с клетками и является одним из механизмов усиливающего действия адъювантов на иммуногенез [0].

Иммунная система реагирует выработкой антител на введение какого антигена. Недостаточное поступление антигенных субстанций приводит к формированию слабого иммунного ответа. Чрезмерная концентрация может привести к перераздражению иммунной системы и, как следствие, – иммунологической толерантности. Поэтому определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцины является необходимым.

В настоящее время спектр профилактических препаратов против сальмонеллеза крупного рогатого скота и свиней представлен как живыми, так и инактивированными вакцинами [0]. Живые вакцины недороги и вызывают сильный иммунитет даже после однократного применения, что упрощает схему иммунизации. Инактивированные и субъединичные вакцины требуют включения адъювантов, и в зависимости от этого и повторного парентерального введения. Они менее удобны, однако более безопасны, и поэтому оптимальны для животных, используемых для воспроизводства [0, 0, 0]. Субъединичные вакцины предпочтительней цельноклеточных, так как содержат необходимый набор протективных антигенов и обладают меньшей реактогенностью и сенсibiliзирующим действием [0]. Итак, основными критериями при выборе вакцин для профилактики сальмонеллеза должны быть минимальная реактогенность и способность к стимуляции напряженного иммунитета [0]. Немаловажным показателем применения вакцин является доза препарата.

Нами была разработана вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота на основе структурных антигенов *Sal. dublin* и *Sal. typhimurium* в соотношении 1:0,7 (в количестве 0,39 мг и 0,27 мг белка в 1,0 см<sup>3</sup> соответственно), 0,25% формалина и 70% адъюванта ISA-70.

**Целью исследования.** приготовление и исследование вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота в условиях производства.

Для выполнения цели поставлены следующие задачи:

1. Получить структурные антигены серовариантов сальмонелл *Sal. dublin*, *Sal. typhimurium* при помощи солянокислого гидроксилamina.
2. Определить иммунизирующую дозу антигенов на белых мышах для установления соотношения антигенных компонентов в вакцине.
3. Выполнить эмульгирование антигенов с масляным адъювантом.
4. Определить иммунизирующую дозу вакцины для стельных коров и телят.
5. Провести производственные испытания вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота в одном из хозяйств Республики Беларусь.

**Материалы и методы.** При постановке эксперимента по определению ИД<sub>50</sub> антигенов сформировано 3 опытных и 3 контрольных группы белых мышей массой 16-18 г. Опытные группы были подразделены на 4 подгруппы: первую иммунизировали нативными структурными антигенами *Sal. dublin*, остальные – разведениями 1:2, 1:4, 1:8; вторую опытную группу – антигенами *Sal. typhimurium* в аналогичном порядке (содержание белка в нативных антигенах составило 2,0-2,2 мг/см<sup>3</sup>). Иммунизацию проводили подкожно в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. Контрольной группе подкожно инъецировали 0,5 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. На 12 день животные заражены 4 ЛД<sub>50</sub> соответствующих штаммов. Учет павших вели в течение 10 дней. ИД<sub>50</sub> рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина.

Технологический процесс производства вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота в лабораторных условиях включал несколько этапов:

1. Реактивация и контроль штаммов-антигенов *Sal. dublin* КМИЭВ В-115 и *Sal. typhimurium* КМИЭВ В-128 на соответствие паспортным данным.
2. Получение матрасной раскладки антигенов.

3. Экстракция структурных антигенов *Sal. dublin* и *Sal. typhimurium* солянокислым гидроксиламином.
4. Детоксикация структурных антигенов формалином.
5. Соединение структурных антигенов с адьювантом ISA-70 (эмульгирование).
6. Фасовка серии вакцины.
7. Маркировка, упаковка и хранение серии вакцины.
8. Контроль вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота по следующим показателям:
  - внешний вид, наличие механических включений;
  - стерильность;
  - стабильность эмульсии;
  - безвредность;
  - реактогенность;
  - иммуногенность.

Были проведены исследования по определению оптимальной дозы вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота на стельных коровах и телятах в скотоводческом хозяйстве Минской области. Сформированы 4 группы животных по 10 голов в каждой. Для иммунизации как стельных коров, так и полученных телят, препарат применяли в объеме 2,0 см<sup>3</sup> и 1,0 см<sup>3</sup> однократно внутримышечно в область средней трети шеи. За иммунизированными животными вели клиническое наблюдение, обращая внимание на реакцию на месте введения вакцины. Оптимальную иммунизирующую дозу вакцины определяли по уровню поствакцинальных антител в РНГА до и на 14, 28 и 45 день после вакцинации (таблица 1).

Для проведения производственных испытаний вакцины подобрали 2 группы стельных коров по принципу пар аналогов. Животных первой, опытной группы, (48 голов) проиммунизировали вакциной (опытным образцом производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского») в дозе 2,0 см<sup>3</sup> однократно внутримышечно, согласно временной инструкции. Телят иммунизировали в 18-22-х дневном возрасте однократно в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. Животные 2 группы служили контролем и обрабатывались вакциной ОКЗ производства фирмы «Агровет» согласно схеме, принятой на комплексе.

За иммунизированными животными вели клиническое наблюдение до отела, обращая внимание на реакцию на месте введения вакцины, у новорожденных телят отмечали поедаемость кормов, заболеваемость, сохранность. О профилактической эффективности вакцины судили по наличию (отсутствию) признаков сальмонеллеза у телят подсосного и послеоъемного периода.

**Результаты исследований.** Полученные структурные антигены сальмонелл содержали белка 2,0-2,2 мг/см<sup>3</sup>, полисахаридов 31,6-33,3 мкг/см<sup>3</sup>. Иммунизация белых мышей, как нативными антигенами, так и их разведениями, не повлияла на общее состояние животных, что свидетельствует о их безвредности для лабораторных животных. ИмД<sub>50</sub> для антигенов *Sal. dublin* составила 0,31±0,05 см<sup>3</sup> (0,68 мг/см<sup>3</sup> белка), для *Sal. typhimurium* – 0,23±0,03 см<sup>3</sup> (0,5 мг/см<sup>3</sup> белка). Исходя из полученных данных (ИмД<sub>50</sub>) установлено, что соотношение антигенов *Sal. dublin*:*Sal. typhimurium* составляет 1-0,7.

Образцы вакцины, приготовленные с использованием масляного адьюванта ISA-70, представляли собой стабильную эмульсию белого цвета. Разработанная вакцина соответствовала параметрам контроля качества, заложенным в технических условиях.

Согласно данным клинических наблюдений, сразу после введения вакцины у коров и телят пальпировали безболезненную, холодную гранулему, диаметром до 1,0 см<sup>3</sup>, которая через 7-10 дней рассасывалась. У 90% животных отсутствовала местная реакция на введение препарата. У 10% отмечено местное повышение температуры через 24-48 часов после иммунизации. Препарат не влиял на общее состояние животных: у вакцинированных животных не зарегистрировано повышения общей температуры, потери аппетита.

Таблица 1 – Уровень поствакцинальных антител в сыворотке крови стельных коров при иммунизации вакциной в объеме 1,0 см<sup>3</sup> и 2,0 см<sup>3</sup>

Объем вакцины, см <sup>3</sup>	день после вакцинации	титр специфических антител (log <sub>2</sub> )	
		<i>Sal. dublin</i>	<i>Sal. typhimurium</i>
контроль	0 (фон)	3,6±0,7	3,8±0,9
2,0	14	10,1±0,7	9,3±0,8
	28	10,3±0,7	10,5±1,1
	45	9,6±1,0	9,5±0,8
1,0	14	9,4±1,0	8,5±1,1
	28	9,9±0,7	9,8±0,8
	45	8,2±0,8	8,3±0,7

Примечание: p≤0,05

Полученные результаты исследований показали, что нарастание титра антител происходило последовательно, наибольшее его значение зарегистрировано на 28 день после иммунизации (10,3 и 10,5 log<sub>2</sub>), на 45 день отмечено некоторое его снижение до 9,5 и 9,6 log<sub>2</sub>. Иммунизация стельных коров вакциной в объеме 2,0 см<sup>3</sup> на 45 день приводила к достоверному увеличению титра специфических агглютининов для *Sal. dublin* на 14,6% (9,6 log<sub>2</sub> - 2,0 см<sup>3</sup>; 8,2 log<sub>2</sub> - 1,0 см<sup>3</sup>) для *Sal. typhimurium* на 12,6% (10,5 log<sub>2</sub> - 2,0 см<sup>3</sup>; 8,3 log<sub>2</sub> - 1,0 см<sup>3</sup>), по сравнению с применением 1,0 см<sup>3</sup> вакцины.

Таблица 2 – Титр поствакцинальных антител в сыворотке крови телят при иммунизации вакциной в объеме 1,0 см<sup>3</sup> и 2,0 см<sup>3</sup>

Объем вакцины, см <sup>3</sup>	день после вакцинации	титр специфических антител (log <sub>2</sub> )	
		<i>Sal. dublin</i>	<i>Sal. typhimurium</i>
контроль	0 (фон)	4,8±1,2	4,7±1,3
2,0	14	8,2±1,7**	7,1±0,7**
	28	10,0±0,7	9,9±0,9**
	45	8,7±0,8*	8,8±1,0
контроль	0 (фон)	5,0±1,2	4,4±0,8
1,0	14	8,6±1,5*	7,4±1,1***
	28	10,2±0,8	10,1±0,9**
	45	8,6±1,0*	9,0±1,2

Примечание: \* $p \leq 0,01$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$

Данные, представленные в таблице 2 показывают, что применение препарата телятам в объеме 2,0 см<sup>3</sup> не оказало существенного влияния на формирование титра антител в сыворотке крови по сравнению с применением 1,0 см<sup>3</sup>. Так на 45 день после иммунизации вакциной в объеме 1,0 см<sup>3</sup> титр антител для *Sal. dublin* составлял 8,6 log<sub>2</sub>, а при иммунизации 2,0 см<sup>3</sup> – 8,7 log<sub>2</sub>. Для сероварианта *Sal. typhimurium* показатель составлял 9,0 и 8,8 log<sub>2</sub> соответственно.

На основании проведенных исследований установлено, что вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота на основе структурных антигенов безвредна для организма животных. Препарат необходимо применять стельным коровам и нетелям в объеме 2,0 см<sup>3</sup>, телятам – в объеме 1,0 см<sup>3</sup>.

Эффективность профилактики желудочно-кишечных заболеваний оценивали у телят с 1-го до 3-х месячного возраста (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят с 1 до 3-х месячного возраста с помощью вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота

Показатели	Единицы измерения	Опытная группа	Контрольная группа
Количество коров в группе	гол	48	45
Количество полученных телят	гол	48	45
Прирост живой массы телят (в среднем по группе)	кг	0,57	0,46
Заболело с признаками гастроэнтерита	гол	3	19
% заболевших	%	6,3	42,2
Средняя продолжительность заболевания	дней	3,0	5,1
Среднесуточный прирост заболевших телят	кг	0,32	0,32
из них пало	гол	-	3
вынужденно убито	гол	-	3
Средний возраст павшего и вынужденно убитого олодняка	дней	-	1-3 месяца
Смертность от гастроэнтеритов	%	0,0	13,3
Сохранность от гастроэнтеритов	%	100,0	86,7
Профилактическая эффективность	%	93,8	57,8

В первый месяц жизни телята содержались в индивидуальныхдомиках, в качестве корма использовано молоко. Отмечена 100%-ная сохранность поголовья. В следующие 2 месяца случаи желудочно-кишечных заболеваний в опытной группе составили 6,3% и в контрольной 42,2% от общего количества животных – профилактическая эффективность в опытной группе на 35,9% выше. Также, в опытной группе показатель выживаемости составил 100%, что выше значения для контрольной группы на 13,3%.

Экономическая эффективность для контрольной группы составила 2,4 рубля на рубль затрат, для опытной группы – 6,1 рубль на рубль затрат.

**Выводы.** 1. Полученные структурные антигены *Sal. dublin* и *Sal. typhimurium* содержат белка 2,0-2,2 мг/см<sup>3</sup>, полисахаридов 31,6-33,3 мкг/см<sup>3</sup>.

2. Соотношение антигенов *Sal. dublin*:*Sal. typhimurium* в вакцине инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота составляет 1:-0,7.

3. Вакцина инактивированная эмульгированная для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота на основе структурных антигенов безвредна и ареактогенна для организма животных, так как не вызывает общей и местной реакций после проведения вакцинации. Препарат необходимо применять стельным коровам и нетелям в объеме 2,0 см<sup>3</sup>, телятам – в объеме 1,0 см<sup>3</sup>.

5. Экономическая эффективность применения вакцины инактивированной эмульгированной для профилактики сальмонеллеза крупного рогатого скота составила 6,1 рубль на рубль затрат.

**Литература:** 1. Алексеева, Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллезов и чумы на основе структурного объединения антигенов и синтетических полиэлектролитов: автореф. дис. ...докт. вет. наук.

14.00.36. Н.Ю. Алексеева. – М., 1997. – 48 с. 2. Захарова И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – Киев: Наукова думка, 1982. – С. 36-37. 3. Ляшенко, В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев. М.: Медицина, 1982. – 272 с. 4. Пак С. Г. Сальмонеллез / С.Г. Пак, М. Х. Турьянов, М. А.Пальцев // М.: Медицина, 1988. – 304 с. 5. Специфическая профилактика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных / Б.Ю. Шустер [и др.] // Ветеринария. – 1994. - № 2. – С. 11-14. 6. Шемельков, Е.В. Антигенная активность вакцины против инфекционных болезней свиней при включении в ее состав адьювантов / Е.В. Шемельков, Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 4— С. 58-63. 7. Мертвцов, Н.П. Современные подходы к конструированию молекулярных вакцин / Н.П. Мертвцов. – Новосибирск, 1987. – 168 с. 8. Forgacs, A. Kontrollmethoden zur Standardisierung der Emulsionsimpfstoffe / A. Forgacs, T.Perenyi, F. Solyom // Phylaxia, Virushauptabteilung, Biochemische Abteilung. – Budapest. – 2001. – P. 46-52. 9. Lindblad, E.B. Aluminium adjuvants — in retrospect and prospect / E.B. Lindblad // Vaccine. – 2004. – Vol. 22. – P. 3658-3668. 10. Veterinary vaccinology / P.-P Pastoret [at al.]. – Elsevier. – 1997. - P. 131-153. 11. Алексеева, Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллезов и чумы на основе структурного объединения антигенов и синтетических полиэлектролитов: автореф. дис. ...докт. вет. наук: 14.00.36 / Н.Ю. Алексеева; Ин-т иммунологии. – Москва, 1997. – 48 с.

УДК 619:576.535:578.824.11

### ОПТИМАЛЬНЫЕ РЕЖИМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛИНИИ КЛЕТОК ВНК-21(с-13)

**Бабак В.А., Ломако Ю.В., Гусев А.А., Чаплыго К.Э., Пунтус И.А., Филипова А.Е.**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

*В статье представлены результаты культивирования линии клеток ВНК-21(с-13) стационарным, роллерным, роллерно-суспензионным и истинно суспензионным методами. Приведены оптимальные параметры глубинного культивирования клеток в лабораторном биореакторе и пилотных аппаратах. Рассмотрены аспекты масштабирования процесса культивирования клеток.*

*In article there are the results of cultivation of cell line ВНК-21(с-13) by the stationary, roller, roller-suspension and by true suspension methods. Optimum parameters of deep cultivation of cells in the laboratory bioreactor and pilot devices are presented. Aspects of scaling of the process cells cultivation are considered.*

**Введение.** Культивирование клеток и вирусов в биотехнологии при производстве живых и инактивированных вирусных вакцин проводится по методам стационарного, роллерного, суспензионного культивирования и на микроносителях [3, 4, 5].

Использование метода стационарного культивирования клеток ограничено большими затратами рабочего времени, материалов и реактивов, при этом урожай клеток лимитирован доступной для роста поверхностью культурального сосуда [4, 10, 12].

Роллерный метод культивирования позволяет получить значительно большие количества клеток по сравнению с традиционным стационарным методом. Он более экономичен, характеризуется оптимальным отношением полезной площади культивирования к объему питательной среды и открывает благоприятные возможности для накопления клеточной массы и получения более высокого выхода вирусного антигена (на 1,0–2,0 Ig в сравнении со стационарным). При этом методе возможны различные пути увеличения площади поверхности роллерных сосудов, на которой происходит прикрепление и размножение клеток [4, 5, 8, 9, 13].

Способность к росту и размножению в роллерных условиях обладают субкультуры, диплоидные и перевиваемые культуры, реже первичные линии. Для лучшего размножения клеток в роллерных аппаратах необходима первичная их адаптация к новым условиям культивирования.

Стационарный и роллерный методы культивирования относятся к непроточным монослойным двухмерным (2D) системам культивирования [7, 11, 13].

Очевидны некоторые преимущества монослойных культур: высокая плотность клеток в монослое; возможность полной замены питательной среды в процессе культивирования; наличие тесных межклеточных контактов, которые требуются для распространения вирусов; частичная контаминация отдельных сосудов не приводит к потере всей серии биоматериала. К недостаткам монослойных культур следует отнести: требование большой поверхности субстрата; высокая стоимость и трудоемкость при масштабировании, трудность отбора проб для контроля; неоднородность получаемого биоматериала; сложность контроля рН и концентрации кислорода.

Рост требований к количеству и качеству разрабатываемых вакцин способствовал усовершенствованию методов культивирования клеток. Принципиальный шаг в этом направлении сделан при разработке суспензионного и псевдосуспензионного методов культивирования.

В 1953 году Оуэнс с сотрудниками впервые показали способность клеток размножаться в жидкой среде в свободно суспендированном состоянии. С тех пор метод суспензионного глубинного культивирования привлекает внимание исследователей в связи с его высокой эффективностью по накоплению больших количеств биомассы клеток, необходимых для промышленного культивирования вирусов. Для суспензионного культивирования клеток во взвеси разработан аппарат «биореактор» для глубинного культивирования клеток и вирусов в питательной среде в условиях стерильности, интенсивного перемешивания, непрерывного продувания стерильным воздухом и постоянной температуры, рН и т.д. Метод суспензионного культивирования клеток и его модификации относятся к проточным истинно-суспензионным системам культивирования [4, 6, 7, 11, 13].

Van Wezel (1967) [14] предложил метод культивирования, сочетающий элементы монослойного и суспензионного выращивания клеток в биореакторах – метод микроносителей. Принцип метода в том, что клетки прикрепляются и размножаются на поверхности полимерных микроносителей, которые находятся во взвеси суспензии с помощью перемешивающего устройства либо зафиксированы в проточной колонке биореактора. Метод культивирования клеток с использованием микроносителей относится к проточным псевдосуспензионным монослойным трехмерным (3D) системам культивирования клеток [4, 11, 13].