

Разработан способ изготовления мелкодисперсного геля ГОА в концентрации 3-5%, приготовленного на изотоническом солевом растворе, с оседаемостью 6-15% для концентрирования ВЯ и создания концентрированных противоящурных и ассоциированных вакцин.

ж) В качестве адъювантов при производстве ПЯВ и конструировании ассоциированных вакцин были проверены импортные сапонины фирмы «Мерк» (США), «PPF» и «BDH» (Англия), «Якобсен» (Германия), «Рон-Пуленк» (Франция), «Хемод» (Чили), JBW (Голландия) и отечественные: теасапонин, аллохрозид, гипсофилин, кукумариозид. Был проведен сравнительный анализ сапонинов. При этом определяли: 1) фракционный состав сапонинов методом хроматографии в тонком слое силикагеля с использованием растворителя «бутанол-этанол-аммиак». Количественной характеристикой являлось количество фракций и коэффициент скорости движения (R/f) компонента по отношению к растворителю; 2) расход гликолевого буфера (рН 10,0) на 1 г сапонины при доведении рН 4%-ного раствора; 3) рН 1% и 4%-ного растворов; 4) оптическая плотность 4%-ного раствора; 5) гемолитическая активность, т.е. предельное разведение сапонины, вызывающее 50%-ный гемолиз эритроцитов; 6) токсичность на морских свинках, т.е. минимальную дозу сапонины, вызывающего гибель 50% животных; 7) адъювантную активность определяли на КРС, на клетках свинных почек и морских свинках с оценкой титров вируснейтрализующих антител, ИмД₅₀ КРС (Рв) и ИмД₅₀ морских свинок (Рс), процент защиты и критерий «К».

Определены параметры входного контроля адъювантов, относящихся к группе сапониноподобных веществ (теасапонины, аллохрозид, кукумариозид): гемолитическая активность не более 1:10000; токсичность: на культуре клеток СП – 0,3-0,9 г на морских свинках – от 100 мг/кг; адъювантная активность (по уровню ВНА, критерию «К» и содержанию ИмД₅₀) согласно требованиям МЭБ и действующей НТД.

Не останавливаясь в деталях на всех количественных показателях для каждого из исследованных препаратов, можно сделать заключение о наибольшей стандартности сапонинов фирмы «PPF» (Англия). В то же время некоторые партии сапонинов фирмы «BDH», «Хемод», «Рон-Пуленк» забракованы при проведении входного контроля (недостаточная растворимость и отсутствие биологически активной фракции), высокой токсичности на культуре клеток и морских свинок. Перспективными являются сапониноподобные вещества отечественного производства (теасапонины, аллохрозид и кукумариозид).

з) Разработана промышленная технология изготовления вакцины для ранней защиты из вируса О₁ шт. 1618. Вакцина при контроле иммуногенной активности обеспечила 100%-ную защиту крупного рогатого скота на 5-е сутки при экспериментальном заражении вакцинированных животных. Уровень ВНА составил не менее 1,5 lg. Разработаны технологии изготовления эмульгированных вакцин, обеспечивающих создание напряженного иммунитета у крупного рогатого скота и свиней. Изготовлены экспериментальные серии ассоциированных вакцин против ящура, бешенства, пастереллеза, инфекционного ринотрахеита и парагриппа для крупного рогатого скота; против ящура, кампилобактериоза, лептоспироза и сальмонеллеза для мелкого рогатого скота. По иммуногенной активности ассоциированные вакцины, содержащие в оптимальном соотношении антиген, сорбент и адъювант, не уступали, а в ряде случаев превосходили иммуногенную активность моновакцин.

и) Разработаны новые и усовершенствованы существующие методы контроля иммуногенной активности противоящурных и ассоциированных вакцин (метод СЕС), что позволило унифицировать способ контроля с практическим внедрением его на биопредприятиях РФ.

Заключение. Разработаны и внедрены методы и средства, обеспечивающие эффективность, стабильность и воспроизводимость основных технологических процессов производства ПЯВ и ассоциированных вакцин, что позволяет получать с гарантией препараты высокого качества.

Литература. 1. Самуйленко А.Я. Оценка активности вируса ящура при промышленном производстве инактивированных вакцин. Автореф. дисс. канд. вет. наук/ М., 1978. - 15 с. 2. Еремец Н.К. Стандартизация качества алюмогидрогеля при получении и разработке условий сорбции некоторых вирусных и бактериальных антигенов. // Дисс... канд. биол. наук.- М., 1985. - С.186. 3. Собко А.И. и др. Определение оптимальной иммунизирующей дозы противоящурной сапониновой ГОА-формолаксина для свиней. // Мет. науч. конф. – Владимир, 1970.- С. 69-70. 4. Инфекционная патология животных: в 2т. /под ред. А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьева, Е.А. Непоклонова, Е.С. Воронина – М., ИКЦ «Академкнига», 2006. - 1911 с. 5. Вирус и вирусные вакцины/ В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер - М., Библионика, 2007. - 524 с. 6. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)/ Под общ. ред. Л.П. Дьяконова – М., Изд. «Спутник+», 2009. – 656 с. 7. Rorher H. Olechnowitz A.F. Maul-and-Klanenschenke // Jena, 1980, p. 560.

УДК619:616.98:578.824.11

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ

Ероховец Н.Ф., Сай Н.Г., Гусев А.А., Обьедков Г.А.

РДУП «Институт экспериментальной ветеринарии им С.Н. Вышелесского»

г. Минск, Республика Беларусь

Разработана технология изготовления и изготовлены образцы лиофилизированной живой вакцины против болезни Ауески свиней, которая соответствует всем параметрам контроля. Вакцина обладает выраженной иммуногенностью, индуцируя развитие стойкого иммунитета у вакцинированных поросят.

The manufacturing techniques are developed and samples liophilized a live vaccine against illness Aueski of pigs which corresponds to all parameters of the control are made. The vaccine possesses expressed immune, inducing development of proof immunity in the vaccinated pigs.

Введение. В последние десятилетия в связи с расширением межгосударственных связей возникает опасность заноса и распространения таких инфекционных болезней животных, как классическая чума свиней, цирковирусная инфекция, грипп, репродуктивно-респираторный синдром и др. Особое значение приобретает

болезнь Ауески свиней. Указанное заболевание, как правило, имеет стационарный характер с заболеваемостью до 70-100% и смертностью до 25-75% [2, 6, 7].

Эпизоотологический мониторинг болезни Ауески, проведенный в Беларуси за 2001 - 2007 годы, показал, что имели место случаи заболевания не только свиней, но и пушных зверей, собак, кошек, кроликов. В некоторых районах в отдельные годы констатировалась стационарность пунктов, неблагополучных по болезни Ауески свиней (Быховский, Могилевский, Слуцкий) [1]. Следует отметить, что отмеченная эпизоотическая обстановка по болезни Ауески в республике установлена на основании комплексных диагностических исследований, т.е. клинических признаков с последующими постмортальными методами диагностики (патологоанатомический, вирусологический). Наряду с указанными методами диагностики этой болезни в республике организованы серологические исследования по обнаружению антител к вирусу болезни Ауески в сыворотках крови свиней. Естественно, что выявляемые при этом антитела нуждаются в уточнении их происхождения, т.е. обусловлены ли они естественным инфицированием или вакцинацией животных, издавна используемой в целях профилактики.

Экономический ущерб при болезни Ауески обусловлен прямыми убытками вследствие гибели значительного количества заболевших животных. Он увеличивается за счет вынужденного убоя поросят, выбраковки туш, снижения живого веса животных, увеличения конверсии корма, недополучения приплода вследствие абортов, затрат на лечебно-профилактические препараты и противозпизоотические мероприятия. Кроме того, даже после ликвидации болезни Ауески, если она имела место в племенных хозяйствах и фермах, согласно действующей инструкции запрещается продавать животных в течение года [3, 2].

Профилактика болезни Ауески свиней во всех государствах с интенсивно развитым свиноводством, в том числе и в Республике Беларусь, имеет важное значение. Ежегодно в каждой области нашей страны вакцинируется от 100,0 до 700,0 тыс. свиней. Общее число вакцинированного поголовья достигало в 2003 - 2004 годах почти 3,0 млн. свиней. Большие объемы вакцинации свиней против болезни Ауески в хозяйствах обусловлены значительным распространением этой болезни в Республике Беларусь в прошедшем столетии и предупреждением распространения инфекции от свиней-вирусоносителей, возможного разноса вируса крысами, ставшими обычными обитателями свиноферм и комплексов. Эти переносчики вирусов являются, на наш взгляд, основными источниками зарегистрированных случаев болезни Ауески у свиней, пушных и других животных нашей республики [4, 5, 8].

Для профилактики болезни Ауески свиней ветеринарные организации республики вынуждены покупать вакцину в России или Голландии, затрачивая на это до 500,0 тысяч долларов США в год.

Исходя из вышеизложенного, мы поставили перед собою цель – разработать технологию изготовления и внедрить отечественную вакцину против болезни Ауески свиней из адаптированного вакцинного штамма, что сэкономит указанные средства.

Научная новизна заключается в разработке оптимальной технологии культивирования вируса в перевиваемых культурах клеток, повышении инфекционной активности вируса, разработке и организации в республике производства живой вакцины против болезни Ауески из адаптированного вакцинного штамма.

Конструируемая вакцина, согласно поставленной цели и задаче, будет дешевле импортной, обладать иммуногенностью и противозпизоотической эффективностью.

Материалы и методы. В течение 2006-2007 гг. проведена селекция по полезным качествам вакцинного штамма вируса болезни Ауески свиней и с учетом результатов разработана технология его культивирования.

Для культивирования данного штамма вируса использовали перевиваемые клеточные линии: ВНК-21, РК-15 как в стационарном, так и роллерном монослоях.

Для получения вирусного сырья отработывалась оптимальная доза заражения, использовали 0,1-0,5, 0,01-0,05 и 0,001-0,005 ТЦД₅₀ на клетку. Исходя из минимального времени (1-2 суток) и более выраженного ЦПД на вышеуказанных клеточных линиях, определена наиболее оптимальная доза заражения для вируса (0,1-0,01 ТЦД₅₀ на клетку). В результате получали вирусное сырье с высокой инфекционной активностью.

Вирусное сырье контролировалось по контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой и активности по титру инфекционности для кроликов и клеточных линий ВНК-21 и РК-15.

Изготовили лабораторный образец вакцины в количестве 200 доз и экспериментальный образец в количестве 7000 доз. Образцы готовили из вирусосодержащей жидкости, которую получали при культивировании вируса в клинских матрасах на ВНК-21 при множественности ее инфицирования из расчета 0,1 - 0,01 ТЦД₅₀ на клетку.

Полученную суспензию вируса смешивали со стерильным стабилизатором и разливали в стерильные флаконы по 2 или 4 см³. Флаконы с препаратом немедленно прикрывали эловскими пробками и подвергали лиофильной сушке по методу Позднякова А.А. и Владимировой А.Г. После окончания сушки флаконы с препаратом переносили в бокс и обкатывали на специально предназначенной для этого машине.

Вакцину контролировали согласно требованиям биологического контроля вакцинных препаратов: внешний вид, наличие или отсутствие посторонней примеси, влажность, растворимость, стерильность, активность вакцины по титру инфекционности в культуре клеток РК-15 или ВНК-21, активность вакцины по титру инфекционности для кроликов, безвредность, иммуногенность.

Внешний вид вакцины, наличие или отсутствие посторонней примеси определяется визуально. Лиофилизированная вакцина представляет собой пористую сухую массу светло-серого цвета, с допустимым слегка розоватым оттенком, без посторонней примеси и плесени.

Растворимость вакцины определяется путем добавления во флаконы (ампулы) с вакциной 10,0 мл физиологического раствора хлорида натрия. Содержимое флакона должно легко растворяться в физиологическом растворе в течение 2-3 минут, образуя равномерную взвесь светло-серого цвета.

Наличие вакуума во флаконах, ампулах с вакциной определяется согласно ГОСТ 28083-89 «Препараты биологические. Методы контроля вакуума в ампулах и флаконах» при помощи прибора для дарсонвализации "Искра - 1". При наличии вакуума внутри флаконов наблюдается фиолетово-синее свечение и характерное потрескивание.

Массовая доля влаги определяется по ГОСТ 24061-89 «Препараты биологические. Метод определения влажности» и не должна превышать 2-4%.

Безвредность вакцины определяется на поросятах 3 - 4-недельного возраста, не имеющих антител к вирусу б. Ауески: 3 пороссятам (опыт) подкожно вводится по 10 доз вакцины, другим 3 пороссятам (контроль) в аналогичном объеме подкожно вводится изотонический раствор хлорида натрия. За всеми животными наблюдают в течение 14 суток с ежедневным измерением температуры тела утром и вечером. Вакцина не должна вызывать у вакцинированных пороссят в течении 14 дней изменения тканей в месте введения вакцины. Допускается повышение температуры тела на 1,5°C в течении 3-5 суток после введения вакцины.

Определение контаминации вакцины бактериальной и грибковой микрофлорой проводят путем посева вакцины из каждого флакона в количестве 0,3-0,5 см³ в пробирки с МПА, МПБ, МППБ, Сабуро и во флаконы с МПБ и МППБ в количестве 2-5 см³. Посевы из одного флакона вакцины производят в две пробирки и в один флакон с каждой средой. Питательные среды с посевами выдерживают в течение 10 суток в термостате при 37-38 °С (для агара Сабуро - 20-22 °С). В питательных средах с посевами не должно быть роста бактериальной и грибковой микрофлоры.

Определение активности вакцины по титру инфекционности в культуре клеток ВНК-21 или РК-15. Готовят десятикратные последовательные разведения вакцины в растворе Хенкса от 10⁻¹ до 10⁻⁸.

Вакциной каждого разведения заражают не менее четырех пробирочных культур клеток ВНК-21 или РК-15 или четырех лунок микротитровального культурального планшета. Окончательный учет результатов титрования вакцины проводят через 120 часов после заражения. Титр инфекционности вакцины (ТЦД_{50/см³}) определяют по методу Рида и Менча и должен составлять не менее 10^{5,5} ТЦД_{50/см³}.

Иммуногенность вакцины определяется в опыте на поросятах с живой массой по 15-20 кг не имеющих антител к вирусу болезни Ауески свиней. Пяти пороссятам вводится внутримышечно по одной дозе вакцины в объеме 1 см³. Двух пороссят не вакцинируют, это контрольная группа. Через 21 сутки отбирают пробы крови от вакцинированных и невакцинированных пороссят с целью получения сыворотки крови для исследования на наличие антител. Во всех исследованных пробах сывороток крови животных контрольной группы не должны выявляться антитела к вирусу болезни Ауески свиней. Вакцина должна вызывать у 4 из 5 вакцинированных животных через 21 день после вакцинации образование антител в соотношении S/N не более 0,5 при использовании тест-системы IDEXX или при проценте блокировки >50% при использовании тест-системы AniGen.

Результаты исследований. Выделен штамм вируса болезни Ауески, отработана технология селекции вируса болезни Ауески свиней, а также лабораторный регламент технологии изготовления и контроля вакцины живой против болезни Ауески свиней. Изготовлены лабораторный и экспериментальный образцы вакцины, проведен её контроль согласно методам контроля.

Установлено, что изготовленные образцы вакцины представляют собой пористую сухую массу светло-серого цвета, с допустимым слегка розоватым оттенком, без посторонней примеси и плесени. Вакцина легко растворяется в физиологическом растворе в течение 2-3 минут, образуя равномерную взвесь светло-серого цвета. Влажность лиофилизированной вакцины не превышает 4%. Изготовленные образцы вакцины безвредны, ареактогенны, так как не вызывают у вакцинированных пороссят в течение 14 дней изменений тканей в месте введения вакцины. Повышения температуры тела после введения вакцины не наблюдали. Вакцина не контаминирована бактериальной и грибковой микрофлорой. Титр инфекционности одной дозы вакцины в культуре клеток ВНК-21 или РК-15 составляет 10^{5,5} ТЦД_{50/см³}. Вакцина обладает выраженной иммуногенностью, вызывая у всех 5 вакцинированных животных через 21 день после вакцинации образование антител в соотношении S/N не более 0,5 при использовании тест-системы IDEXX или при проценте блокировки >50% при использовании тест-системы AniGen.

Заключение. 1. Разработана технология изготовления и изготовлены лабораторный и экспериментальные образцы лиофилизированной живой вакцины против болезни Ауески свиней.

2. Вакцина соответствует параметрам контроля по внешнему виду, отсутствию примеси, контаминации бактериальной и грибковой микрофлоры, безвредности.

3. Вакцина обладает выраженной иммуногенностью, индуцируя развитие стойкого иммунитета у вакцинированных пороссят.

Литература. 1. Баборенко Е.П. Иммунобиологические свойства штаммов вируса болезни Ауески. Автореферат канд. биол. наук, Владимир, 1996, 23 с. 2. Katakawa A.; Flo Thi Viet Thu; Yamada S.; Yamasaki S.; Taniguchi T. Проблемы диагностики и вакцинопрофилактики болезни Ауески, репродуктивно-респираторного синдрома и классической чумы свиней на фермах в дельте р. Меконг, Вьетнам. (Вьетнам. Япония). -Р. 25-33. 3. Коломыцев А.А. (Всероссийский НИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии); Стрижаков А.А.; Амирова И.В. Анализ эпизоотической ситуации и эффективности мер борьбы с болезнью Ауески в мире. -С. 157-162. Вет.патология, 2008; N 1. 4. Константинов А.В. Разработка способа получения вирусвакцины против болезни Ауески свиней и овец из маркированного штамма «ВК», изучение её иммунобиологических свойств. Автореферат канд. ветеринарных наук, Владимир, 2003, 26 с. 5. Сергеев В. А., Лаптев Ю. В., Жестерев В. И. Выращивание вируса болезни Ауески в различных культурах клеток и его иммуногенные свойства// Тр. ВИЭВ - 1987. - Вып. 64. - с. 24-28. 6. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. и др. Вирусные болезни животных. Москва, 1998, с. 926. 7. Томеску В. и др. Зоонозы. М. 1982, с.175-177. 8. Цымбал А. М., Конаржевский К. Е., Белоконов В. С. и др. Вирулентные и иммуногенные свойства вируса болезни Ауески, репродуцированного на перевиваемых клетках линии СПЭВ, культивируемых на различных питательных средах// Ветеринария (Киев) 1989. - Вып. 64. - С. 3-4.