

Заключение. Полученные данные наших исследований свидетельствуют о том, что на всей территории Нижнего Поволжья, в которую входят Волгоградская и Астраханская области, присутствует достаточно большое разнообразие в видовом отношении иксодовых клещей - 24 вида. Доминирующими видами являются иксодовые клещи из рода *Hyalomma*, а субдоминантами из рода *Dermacentor*. Также нами отмечено, что на территории Астраханской области отсутствуют иксодовые клещи из рода *Ixodes*, которые зарегистрированы на территории Волгоградской области.

Литература. 1. Балашов Ю.С. Иксодовые клещи- паразиты и переносчики инфекций/ Ю.С. Балашов // Санкт-Петербург, 1998. 285 с. 2. Колонин Г.В. Мировое распределение иксодовых клещей род *Haemaphysalis*/ Г.В.Колонин // -М. 1978. 72 с. 3. Колонин Г.В. Мировое распределение иксодовых клещей род *Ixodes* / Г.В.Колонин// -М.. 1981 116 с. 4. Колонин Г.В. Мировое распределение иксодовых клещей роды *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Dermocentonomma*, *Voophilus*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicerphalus*, *Margaropus*, *Anomalohim-alaya* / Г.В.Колонин // - М. 1984 96 с. 5. Колонин Г.В. Мировое распределение иксодовых клещей роды *Hyalomma*, *Aponomma*, *Amblyomma*. / Г.В.Колонин // М. 1983. 121 с. 6. Кербабаев Э.Б. Основы ветеринарной акарологии. Методы и средства борьбы с клещами // Труды ВИГИС, 1998. М. Т. №34. 218. с. 7. Павловский Е.Н. Основы учения о природной очаговости трансмиссивных болезней человека./ Е.Н.Павловский // Журн. общ. биологии. 1946. Т. №7. С. 3-30. 8. Павловский Е.Н. Общие проблемы паразитологии и зоологии/ Е.Н.Павловский // М., Л. 1947. 424 с. 9. Павловский Е.Н. О синтезе учения о природной очаговости болезней и теории паразитоценозов. /Е.Н.Павловский //Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунол., 1957. №7. С. 11-18. 10. Ю Павловский Е.Н. Общие проблемы паразитологии и зоологии./Е.Н.Павловский // - М, Л. 1961. 424 с. 11. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней./ Е.Н.Павловский // - М 1964. 211. с. 12. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*./ Н.А. Филиппова // - СПб 1977.396с.

УДК: 619:616:98:578.835.2

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН

Еремец В.И., Самуйленко А.Я., Еремец Н.К.

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН, г. Щелково, Россия

Зенов Н.И., Бобровская И.В.

ФГУП «Щелковский биокомбинат», г. Щелково, Россия

Представлены результаты производства и контроля противовирусных вакцин на модели вируса ящура.

Results of manufacture and the control antivirus vaccines on virus model lizards are presented.

Введение. Вирус ящура и противоящурные вакцины могут быть взяты в качестве модели при разработке и изготовлении противовирусных вакцин широкого спектра. Это обусловлено тем, что при их конструировании необходимо использовать методы и способы водоподготовки, получения штаммов краткосрочного и длительного хранения, изготовления питательных сред для транспортировки сырья и культивирования подбора входного контроля и использования средств очистки и концентрирования, инактивации, сорбции, применения различных адъювантов и т.д.

Географическое положение России как буферной зоны между Европой, относительно благополучной по ящуру, и Азией, где постоянно возникают очаги этого заболевания, обуславливает постоянную необходимость разрабатывать и совершенствовать меры борьбы с этой инфекцией.

Вакцинопрофилактика до настоящего времени остается основным ветеринарно-санитарным мероприятием по предупреждению эпизоотии ящура. Однако сам подход к изготовлению противоящурных вакцин (ПЯВ), в силу объективных причин, меняется. На первый план выходят проблемы создания стратегического резерва вакцин в виде высококонцентрированного антигена, изготовления универсальных ПЯВ, предназначенных для различных видов животных, и совершенствование качества на всех этапах производства и контроля препарата. Целью работы являлось проведение комплексных исследований по оптимизации большинства этапов технологии производства ПЯВ и ряда ассоциированных с вирусом ящура вакцин, усовершенствование и унифицирование методов входного контроля сырья, межоперационного контроля и оценки качества готовых биопрепаратов.

Материалы и методы исследований. В работе использовали ВЯ типов О, А, и С. Использовали культуры клеток первичнотрипсинизированных клеток СП, КП, перевиваемых линий клеток ВНК 21/13, СПЭВ, ЛЭК, МДВК, АИС, СТ, RSK, ПП. Применяли гель ГОА различных модификаций, димерэтиленимина, сапонины и др. Получение воды проводили на установках «Сите», «Лабконко», «Супер-Q» и «Милли-Q». При изготовлении питательных сред использовали методы определения рН, криоскопического показателя, хроматографический анализ в тонком слое силикагеля, анализ аминокислотного состава на автоматическом аминокислотном анализаторе. Качество вирусосодержащих культуральных жидкостей оценивали по значениям комплементсвязывающей активности на автоанализаторе «Техникон», инфекционной активности на культуре клеток СП, содержание белка по методу Лоури, содержанию 146S-компонента с использованием зонального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Применена модифицированная схема технологического процесса культивирования ВЯ на эксплантатах эпителия языка крупного рогатого скота (ЭЭЯ), очистки, концентрирования, инактивации и сорбции антигена. Контроль ПЯВ по показателю иммуногенной активности проводили на морских свинках (метод Рс) и крупном рогатом скоте (методы Рв и СЕС).

Результаты исследований. Основными результатами комплексных исследований, обеспечивающих получение высокоактивного антигена ВЯ, эффективности процессов очистки, инактивации, сорбции ВЯ и изготовления авирулентных, безвредных и высокоиммуногенных вакцин являются следующие:

а) Критериями качества ЭЭЯ крупного рогатого скота, служащих субстратом для культивирования ВЯ, обеспечивающих получение высокоиммуногенных вакцин, являются: доставка эпителия при температуре $10+2^{\circ}\text{C}$ до 60 часов после убоя животных; содержание в консервирующей среде при доставке эпителия не более 10^4 микробных тел в 1 мл; исключение использования стерильного эпителия за счет обработки его дезинфицирующими средствами и ультрафиолетовым светом; использование сбалансированной питательной среды для транспортировки эпителия. Разработана классификационная карта оценки качества ЭЭЯ КРС 28 мясокомбинатов – поставщиков сырья, в том числе 2-х мясокомбинатов Республики Беларусь (Минск, Могилев). В качестве показателей, наиболее полно отражающих качество эпителия, определены: процент жизнеспособных клеток, комплементсвязывающая активность и содержание 146S-компонента в вирусосодержащем материале.

б) Разработана технология получения гидролизатов мышечных белков и крови. Показана эффективность их использования в составе среды для транспортировки ЭЭЯ крупного рогатого скота и сред для культивирования клеток и ВЯ. С использованием хроматографических методов исследования, результатов оценки репродуктивной способности ВЯ стандартизирован состав сред, определена оптимальная концентрация гидролизатов белков. Для консервирующей среды, в зависимости от вида гидролизата, оптимальная концентрация - 0,1-0,4%, для культуральной среды – 0,4-0,6%. Разработка технологий изготовления гидролизатов мышечных белков и крови позволила использовать животных, выходящих после контроля вакцин, как источник сырья в «замкнутом» цикле производства и решить проблему утилизации отходов и повысить экологическую безопасность производства противоящурных вакцин.

в) Для обеспечения качества питательных сред, культур клеток и ВЯ необходим постоянный мониторинг качества воды, для очистки которой использованы различные установки и технологические процессы. Так, для получения сред Игла, 199 рекомендуется использовать сверхчистую воду, полученную, в частности, на установке типа «Super-Q». Нами определено, что в качестве тест-культур для оценки качества воды и питательных сред могут быть использованы перевиваемые линии клеток ЛЭК, СТ, RSK, МВДК, СПЭВ. Для контроля сред на основе солевых растворов Эрла и Хенкса, содержащих ГЛА, ФГМ-С, ГСБМ, гидролизаты белков крови возможно использовать первичную культуру клеток СП. ВЯ, полученный на ЭЭЯ КРС, можно использовать для различных способов промышленного культивирования: а) в течение 13 пассажей на эпителии языка и б) при проведении перемежающихся пассажей на эпителии языка и культуре клеток ВНК-21/13. Это позволяет унифицировать схему адаптации ящура для различных технологий производства ПЯВ, а также приготовления вирусосодержащего материала длительного и краткосрочного хранения, проводить процесс усиления антигенных свойств ВЯ.

г) Исследованы в сравнительном аспекте способы очистки и консервирования ВЯ, культивируемого на ЭЭЯ крупного рогатого скота, с использованием хлороформа, фреона-113, метилхлорида и производных полигуанидов. Установлено, что эффективным и экологически наиболее безопасным является использование метилхлорида в концентрации 1,2%. Применение производных полигуанидинов в концентрации 0,01%, а также в сочетании с хлороформом (0,8%) обеспечило получение свободного от бактериальной микрофлоры вирусосодержащего материала в 66-100% случаев.

д) Наиболее важным и ответственным моментом в производстве ПЯВ является подбор инактиванта, обеспечивающего, с одной стороны, целостность протективного антигена, с другой – полноту инактивации инфекционного начала. В работе использовали формальдегид, производные азиридинов, в частности, димер этиленимина, β -пропиолактон, метиаглюксаль. Определены режимы инактивации ВЯ O_1 шт. 1618, A_{22} шт. 550 и C_1 шт. 564. В частности, установлена линейная зависимость потери инфекционной зависимости ВЯ от времени при использовании ДЭИ, выраженная уравнениями 1-го порядка:

$$Y = 7,4 - 0,39t \text{ (для } A_{22} \text{ шт. 550)}$$

$$Y = 7,0 - 0,45t \text{ (для } O_1 \text{ шт. 1618)}$$

$$Y = 7,0 - 0,47t \text{ (для } C_1 \text{ шт. 564)}$$

Изучение динамики инактивации ВЯ вышеуказанных типов, полученного при культивировании на ЭЭЯ КРС с использованием в составе питательных сред как аминокислот, так и ферментативного мышечного гидролизата, подвергнутого двукратной обработке хлороформом (или в комбинации с другими веществами) и сепарированию показало: для типа A_{22} шт. 550 условия инактивации 27°C , 0,04% ДЭИ, 18-24 час. гарантировали получение полностью инактивированного вируса. При этом сравнение активности вируса даже после 24 час. инактивации не выявило статистически значимых различий (по показателям комплементсвязывающей активности и содержанию 146S-компонента ВЯ $t_{\text{экл.}} < t_{\text{табл.}}$). Проверка свойств вируса при хранении при $4-8^{\circ}\text{C}$ показала незначительное падение активности вируса через 10 суток (0,2 мкг/мл (6,4%) 146S-компонента, от 10 до 18 ед. комплементсвязывающей активности. Приблизительно такие же результаты были получены для вируса O_1 шт. 1618 и C_1 шт. 564, что позволило рекомендовать использование более жестких условий инактивации ВЯ всех трех типов, что гарантирует получение инактивированного вируса с сохранением достаточного количества протективного антигена для получения высокоиммуногенных авирулентных вакцин.

е) Усовершенствована технология получения геля ГОА из алюмоаммонийных и алюмокалиевых квасцов различной степени чистоты. Установлена связь показателей физико-химического контроля и адсорбционной активности к вирусу ящура типов O , A , C с результатами оценки морфологии, фазового состава и удельной поверхности геля ГОА.

Таблица - Структурно-сорбционная характеристика ГОА

	Свежеприготовленный ГОА	ГОА через 1 год хранения
Фазовый состав	псевдобемит	псевдобемит, байеринт
Удельная поверхность ($\text{м}^2/\text{г}$)	350-374	257-339
Морфология	глобулы, фибриллы	глобулы, фибриллы, отдельные соматоиды
Сорбционная активность к ВЯ, в 25%-ной концентрации (%)	100	100

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-Klanenschenche // 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