

важнейшим фактором роста ее конкурентоспособности.

### Список литературы

- 1 Экономика предприятия. В 2 ч. Ч. 2: учеб. пособие / А.С. Головачев. – Минск: Выш. шк., 2008. – 447 с.
- 2 Тетеринец, Т.А. Совершенствование механизма амортизации основных средств в промышленности Республики Беларусь / Т.А. Тетеринец // Экономический бюллетень НИЭИ Министерства экономики Республики Беларусь. – 2009. – № 4. – С. 63-70.
- 3 Статистический ежегодник Республики Беларусь. 2009 : стат. сборник / редкол.: В.И. Зиновский [и др.] – Минск: Нац. стат. комитет Респ. Беларусь, 2009. – 600 с.
- 4 Постановление Совета Министров Респ. Беларусь. 18 дек.2007 г. № 1777, О программе развития автомобильной отрасли Республики Беларусь на 2007-2010 гг.

УДК: 619: 616.98: 578.825.1

## КОНСТРУИРОВАНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ГЕ-НЕГАТИВНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИИ

Чаплыго К.Э.

*РВП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского, г. Минск*

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Ауески (БА) – остро протекающее вирусное заболевание всех видов домашних и диких животных, характеризующееся поражением центральной нервной системы (ЦНС), органов дыхания, абортами и расчесами на месте проникновения возбудителя (у всех животных за исключением свиней, норки и соболей).

БА главным образом ассоциируется со свиньями, являющимися естественным хозяином и резервуаром инфекции в природе. Взрослые свиньи после клинического выздоровления остаются пожизненными вирусоносителями, в организме которых вирус сохраняется в латентном состоянии. Реактивация вируса может произойти под воздействием любого стресс-фактора (перегруппировка животных, проведение профилактических обработок, опорос и т.д.) и животные снова становятся опасным источником инфекции не только для свиней, но и для животных других видов. В связи с этим БА приобретает особое значение в странах с развитым свиноводством.

Возникновение БА среди молодняка практически всегда заканчивается летально, при этом смертность среди новорожденных животных достигает до 90-100%, среди поросят первого месяца жизни – до 60%. Для инфицированных поросят характерно поражение ЦНС с развитием характерного симптомокомплекса. С увеличением возраста животных проявление клинических признаков и уровень смертности уменьшается, поэтому у взрослых свиней обычно наблюдаются только симптомы поражения верхних дыхательных путей с последующим клиническим выздоровлением. Заболевание свиноматок приводит к резкому нарушению воспроизводства стада: аборты, мертворождение, мумификация плодов. Переболевшие свиньи малопродуктивны для откорма и непригодны на племя вследствие остаточных патологических явлений [2], [3].

Из-за наличия БА свиноводство несет значительные экономические убытки, которые складываются из падежа, вынужденного убоя, снижения прироста массы животного, потери племенных качеств, выбраковки гуп, абортов, затрат на

ликвидацию и профилактику болезни. При этом следует отметить, что прямые потери от БА часто занижаются, т.к. во многих случаях заболевание у инфицированных животных точно не диагностируется.

Международный опыт показывает, что искоренение БА на территории страны возможно, при применении методов борьбы включающих выявление инфицированных животных и их выбраковка, а также реализация комплекса санитарно-эпидемиологических и др. мер. В то же время, использование таких методов борьбы в странах с высоким процентом инфицированных животных требует больших экономических затрат, поэтому альтернативным способом решения проблемы является выявление и выбраковка инфицированных животных без прекращения вакцинации.

В последние два десятилетия в большинстве стран ЕС реализуются национальные программы по искоренению БА данным способом. Важное место в этих программах отводится вакцинации с использованием только маркированных вакцин [1].

Маркерные вакцины основаны на штаммах имеющих делецию в одном из генов, кодирующих гликопротеины оболочки вируса, удаление которых не оказывает существенного влияния на его репродукцию. Основное преимущество маркерных вакцин состоит в том, что после их применения с помощью дискриминантных наборов ИФА можно провести дифференциацию поствакцинальных антител от постинфекционных, т.к. эпизоотические штаммы имеют весь набор гликопротеинов.

**Цель:** разработка инактивированной маркированной по гликопротеину Е (gE) вакцины против БА и изучение ее иммунологических свойств в лабораторных условиях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Накопление вирусной биомассы проводили в перевиваемой линии культуры клеток ВНК-21(с-13) с применением роллерного или суспензионного способа культивирования.

При роллерном способе накопления вируса, использовали 2-3 суточную культуру клеток ВНК-21(с-13) с полностью сформировавшимся монослоем. Делеционный по gE штамм вируса БА КМИЭВ-V106А вносили в роллер из расчета 0,01-2,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. с контактом на 60 мин. В качестве поддерживающей среды использовали различные комбинации сред ФГМ-с, ГЛА, ГЕМ, ДМЕМ, МЕМ (ИГЛА) с добавлением от 1 до 5% сыворотки КРС, глутамина и глюкозы. Количество заполнения роллерного сосуда объемом 2 л средой составляло от 100 до 300 мл, скорость вращения сосудов при этом была равна 0,4-0,7 об/мин. Культивирование вируса осуществляли до проявления цитопатического действия (ЦПД) вируса на 70-100% площади клеточного монослоя.

При суспензионном способе культивирования вируса, первоначально проводили накопление суспензии культуры клеток ВНК-21(с-13) с применением периодического метода культивирования до значения концентрации клеток 1,0-3,0 млн. кл/мл. Вирус вносили из расчета 0,1-2,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Культивирование осуществляли до появления 70-80% мертвых клеток в суспензии. Жизнеспособность клеток определяли с помощью подсчета клеток в камере Горяева, после окраски их 0,2%-ным раствором трипановой сини.

Полученную роллерным или суспензионным способом вирусную биомассу проверяли на инфекционную активность методом титрации в монослойной культуре клеток ВНК-21(с-13) согласно методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в модификации Ашмарина и выражали в Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл [4].

Вирус с титром инфекционной активности не менее 8,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, очищали от клеточного детрита посредством центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 мин. и подвергали инаktivации теотропином в конечной концентрации 0.1% при t-37°C, значении pH 7,8-8.0 экспозиции 24 часа при периодическом перемешивании.

Полноту инактивации вируса определяли в культуре клеток ВНК -21(с-13), не менее чем в 3-х последовательных пассажах. Отсутствие ЦПД в культуре клеток в течение 5 сут. подтверждало авирулентность инактивированного вируса.

Инактивированный вирус смешивали с масляными адьювантами производства фирмы Serrip под торговой маркой ISA-35, ISA-206, ISA-760, с применением гомогенизаторов фирмы Braun или IKA до получения гомогенной эмульсии.

Полученную эмульсию проверяли на стабильность посредством центрифугирования образца объемом не менее 10 мл в течение 30 мин. при 3000 об/мин. Вакцину считали стабильной при отсутствии визуального нарушения ее внешнего вида. Отклонения во внешнем виде в виде: отслоения прозрачного масляного слоя над поверхностью эмульсии (для ISA -760), расслоения эмульсии на 2 фазы, отличающиеся между собой по цветовой гамме на тон (для ISA -206), образование слоя белого цвета на поверхности эмульсии (для ISA- 35) считались не критичными, если их можно было устранить при встряхивании флакона.

При лабораторном испытании полученные образцы вакцины проверяли на стерильность, реактогенность, безвредность, антигенность и иммуногенность.

Стерильность полученных образцов вакцины контролировали высевом на элективные среды. На среды Сабуро, МПА и МПБ вакцину высевали в объеме 0,5 мл, а на среду Китта-Тарощи – по 1 мл в пробирки. Пробирки с посевами на средах МПА, МПБ и Китта-Тарощи выдерживали в термостате при  $(37 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$ , на среде Сабуро – при  $(21 \pm 1,0)^{\circ}\text{C}$  в течение 10 суток. Вакцину считали стерильной, если ни в одной из засеянных пробирок по истечению указанного срока рост микроорганизмов не был обнаружен.

Реактогенность вакцины контролировали количественным методом на белых мышах и качественным методом на свиньях.

Белым мышам ( $n=10$ ) массой 18-20 г, в одну из задних лапок подкожно в области стопы вводили образцы вакцины в объеме 0,05 мл. Через 10 дней после введения вакцины, животных усыпляли, задние лапки обрезали по скакательный сустав и взвешивали. Индекс реактогенности рассчитывали по формуле:

$R = (\Sigma \text{Mo} / \Sigma \text{Mk} - 1) * 100\%$ , где  $\Sigma \text{Mo}$  - сумма массы лапок опытной группы животных,  $\Sigma \text{Mk}$  - сумма массы лапок контрольной группы животных.

Свиньям вакцину ( $n=3$ ) вводили в объеме 2 мл внутримышечно в области шеи. Реактогенность оценивали посредством визуального осмотра места введения вакцины (наличие покраснения) с проведением его пальпации (определение местной температуры ткани, наличие припухлости, болезненность), а также с проведением термометрии.

Безвредность препарата определяли на белых мышах ( $n=20$ ), массой 16-18 г, которым вводили подкожно 1 мл вакцины, с последующим наблюдением за клиническим состоянием животных в течение 10 суток.

Иммуногенность вакцины на лабораторных животных проверяли иммунизацией морских свинок ( $n=4$ ) вакциной в неразведенном виде в дозе 1 мл и двукратными разведениями в плацебо. Через 21 сутки после вакцинации всех иммунизированных и контрольных животных заражали эпизоотическим штаммом вируса БА в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>/мл. Оценку иммуногенности проводили по величине минимальной дозы вакцины, обеспечивающей 50-% защитный эффект (ИмД<sub>50</sub>/мл).

Антигенность и маркерность вакцины определяли на подсвинках ( $n=3$ ) живой массой 30-40 кг, серонегативных по БА. Подсвинков вакцинировали образцами вакцины в дозе 2 мл 2-кратно с интервалом 14 дней. Пробы крови для получения сывороток отбирали перед вакцинацией, а также на 14, 28 день после первой вакцинации, и проверяли в ИФА с помощью наборов «Ауески gE - СЕРОТЕСТ» производства ООО «Ветбиохим» (Россия) для подтверждения отсутствия антител к gE, набора ANTIGEN PRV gB Ab ELISA производства Animal Genetics (Корея) для



выявления титров к г В.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах по подбору и модификации поддерживающей питательной среды использовали комбинацию питательных сред на основе гидролизатов белков животного происхождения ФГМ-с, ГЛА, ГЕМ с синтетическими средами МЕМ (ИГЛА) и ДМЕМ в пропорциях от 1-3:3-1. Во всех вариациях питательных сред присутствовали глюкоза и глютамин. Также был проведен опыт по определению влияния концентрации сыворотки КРС в поддерживающей среде на репродукцию вируса.

Результаты исследований показали, что оптимальной для культивирования вируса является поддерживающая среда состоящая из ФГМ/ДМЕМ (3:1), ФГМС/ГЛА/ДМЕМ (2:1:1), ГЕМ/ГЛА/ДМЕМ или ИГЛА (3:1) с добавлением глюкозы (до 4000 мг/мл), глютамина (200-300 мг/мл) и сыворотки КРС до 5%. Культивирование вируса в безсывороточной среде, при соблюдении остальных параметров, приводило к накоплению его в более низких титрах и увеличению времени накопления. Отсутствие в составе среды глюкозы и глютамина, а также комбинирование используемых сред в сторону процентного увеличения содержания синтетических сред, существенно влияло на показатель инфекционной активности полученного биоматериала.

При ролерном способе культивирования вируса было установлено, что при инфицировании клеточного монослоя ВНК-21(с-13) вирусом в количестве 0,1-1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл наблюдалось максимальное его накопление в титре не менее 8,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл через 1-2 суток культивирования. Снижение множественности заражения до значения 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл, приводило к уменьшению выхода вируса в среднем на 1,0-1,2 lg и увеличению сроков его культивирования до 3-х и более суток. Увеличение множественности заражения до 2,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл., существенно не влияло на конечный титр вируса и не значительно сокращало период его накопления.

Для отработки суспензионного способа культивирования вируса в лабораторном биореакторе BioFlo 110 с рабочим объемом 5 л, на первом этапе проводили накопление суспензии клеток ВНК-21(с-13) периодическим методом. При этом оптимальными параметрами культивирования клеток оказались: температура + 37,0°C, перемешивание с помощью двудерной лопастной мешалки-110-160 об/мин, режим аэрации – 0,5–2 объема/ч (9–18 % кислорода), значение pH – 6,9–7,3, посевная концентрация клеток – 0,3–0,7 млн. кл./мл, период культивирования 48-72 часа. На втором этапе осуществляли заражение полученной суспензии клеток штаммом вируса. Было установлено, что заражение клеточной суспензии в концентрации 1,7-2,3 млн. кл./мл в дозе 0,5-1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. обеспечивала проявлению 70-80% ЦПД в течение 24-36 часов. При соблюдении данных параметров культивированию средний выход титра инфекционной активности вируса составил 8,0-8,7 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Вирусную суспензию с титром не менее 8,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл подвергали очистке и инаktivации теотропином в конечной концентрации 0,1% при значении pH 7,8-8,0 и времени экспозиции 24 часа в режиме периодического перемешивания. Результаты опыта на проверку полноты инаktivации методом 3-кратных последовательных пассажей материала в культуре клеток ВНК-21(с-13) показали, что данный способ инаktivации позволяет получить вирус полностью лишенный инфекционного начала и пригодный для изготовления вакцины.

Эмульсионную вакцину готовили посредством диспергирования авирулентного вируса в масляных адьювантах ISA -206, ISA -35, ISA-760 в соотношениях 1:1, 3:1, 1:3. Диспергирование при использовании адьювантов ISA-206 и ISA-35 производили на гомогенизаторе IKA RW20 digital при соблюдении параметров: 500-1000 об/мин, в течение 10-15 минут, при общем объеме образца 400-500 мл, до получения однородной эмульсии кремового или белого цвета с розовым оттенком. При применении в качестве

адьюванта ISA -760 диспергирование осуществляли с помощью Braun 600 Watt turbo с соблюдением параметров: 5000-6000 об/мин. в течение 3-4 мин. при общем объеме образца 400-500 мл. до получения однородной эмульсии белого цвета с розовым оттенком. Для приготовления эмульсионной вакцины в объемах больше 5 л использовали гомогенизатор полупромышленного типа IKA magic lab. с применением модуля UTL (для ISA-35 и ISA -206) или модуля Dispax-reactor DR (для ISA-760).

Полученные образцы вакцины были проверены на стабильность. В результате проведенного опыта было установлено, что изготовление эмульсионной формы вакцины с применением данных адьювантов и параметров их диспергирования с вирусом позволяют получить эмульсии прямого (ISA-35), множественного (ISA-206) и обратного (ISA-760) типов, которые остаются стабильными после центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 мин.

Реактогенность образцов вакцины определяли в опытах на белых мышах. Исходя из полученных величин процента отека лапки, вакцину расценивали, как слабо реактогенной, если индекс не превышал 24%, умеренно реактогенной, если индекс составлял 25-50%, выраженно реактогенный, при значении индекса 50-100%.

Результаты исследований вакцины на реактогенность приведены в таблице 1.

**Таблица 1.- Реактогенность вакцины в зависимости от используемого адьюванта.**

№	Адьювант	Средний вес лапок, г		Индекс реактогенности, %
		Опыт	Контроль	
1.	ISA- 35	0,1478	0,1092	35,34
2.	ISA- 206	0,1459	0,1073	35,97
3.	ISA- 760	0,1592	0,1085	46,72

Из данных таблицы 1 видно, что все образцы вакцины являлись умеренно реактогенными препаратами, т.к. индекс реактогенности не превышал значения 50%. Большее значение индекса при применении ISA -760 по сравнению с другими адьювантами, объясняется высоким содержанием масла в составе эмульсии (70%).

При контроле реактогенности вакцины на свиньях были получены следующие результаты: в первые дни, после иммунизации, на месте введения вакцины наблюдалась незначительная малоболлезненная припухлость, которая рассасывалась через 4-6 дней. Все животные во время опыта выглядели клинически здоровыми, отказа от корма не наблюдалось, температура тела была в пределах физиологической нормы.

При оценке безвредности вакцины на белых мышах, все препараты оказались безвредным, т.к. все опытные животные остались живы и клинически здоровы, в течение всего срока наблюдения.

Иммуногенность вакцины определяли посредством контрольного заражения вакцинированных морских свинок. Полученные результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2.- Иммуногенность вакцины в зависимости от используемого адьюванта.**

№	Адьювант, %	Авирулен т-ный вирус, %	Результаты контрольного заражения (пало/выжило)					
			цельное	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	ISA - 35 (30)	70	0/4	0/4	0/4	2/4	4/0	4/0
2	ISA -206 (50)	50	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/0
3	ISA -760 (70)	30	0/4	0/4	0/4	0/4	2/4	4/0
4	-	-	4/0	-	-	-	-	-

Из таблицы 2 видно, что однократная подкожная иммунизация морских свинок эмульсионной вакциной против БА обеспечивает их защиту от контрольного заражения эпизоотическим штаммом в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>/мл на 21 день после вакцинации. Иммунизирующая доза вакцины для морских свинок при этом составила 0,2 мл для образца №1 (ISA -35) и 0,1 мл для образцов №2 и №3 (ISA -206 и ISA -760).

Для определения антигенной активности вакцины, сыворотки проб крови, отобранные от подсвинков перед иммунизацией и на 14, 28 дни после первой вакцинации, были проверены на наличие антител к гВ постановкой твердофазного ИФА. Результаты, полученные в ИФА, показали, что пробы сывороток, отобранные перед вакцинацией, являлись отрицательными, что подтвердило серонегативность опытных животных, а сыворотки, полученные на 14 и 28 дни после вакцинации, являлись положительными и процент блокировки для них находился в пределах 86-90%.

Маркерность вакцины была подтверждена постановкой метода конкурентного ИФА. С исследуемыми пробами была получена отрицательная реакция, что указывает на отсутствие специфических антител в сыворотке, и в свою очередь свидетельствует о проведении вакцинации маркированной по гЕ вакциной.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология изготовления инактивированной гЕ-негативной вакцины против болезни Ауески включающая: накопление делеционного штамма КМИЭВ-V106А с титром инфекционной активности 8,0-8,7 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл в культуре клеток ВНК-21 (с-13) роллерным или суспензионным способом, инактивацию теотропином и диспергирование в масляных адьювантах ISA -206, ISA -35 или ISA-760. Проверка иммунобиологических свойств вакцины проведена на лабораторных (белые мыши, морские свинки) и целевых животных (свиньи) в лабораторных условиях. Результаты проведенных исследований показали, что разработанная вакцина является безвредным, ареактогенным и высокоиммуногенным препаратом.

### Список литературы

1. Кукушкин, С.А. Контроль болезни Ауески в свиноводстве с использованием маркированных вакцин [Электрон. ресурс].-2010.-Режим доступа: <http://www.ariah.ru/PrivateWeb/books/vet-congress-2009-swine-pathology/files/7.html> - Дата доступа: 14.09.2010.
2. Максимович, В. В. Инфекционные болезни свиней / В. В. Максимович. -Витебск: УОВГАВМ. 2007. – 373 с.
3. Самуйленко, А. Я. Инфекционная патология животных / А. Я. Самуйленко [и др.]. – М.: Академкнига. 2006. – 830 с.
4. Сюрин, В.Н. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных/ В.Н. Сюрин [и др.]-М.: Агропромиздат. 1986.-351 с.