

получены отрицательные результаты.

Выводы

Таким образом, после созревания продуктов убоя свиней, убитых с клиническими проявлениями ящура через 4 суток после заражения вирусом ящура, величина рН составляла 6,0. При этом возбудитель ящура был выявлен в большем количестве проб, чем у свиней через 8 суток после заражения, когда уже происходило выздоровление животных и разрушение (инактивация) вирусов в некоторых тканях. По эффективности обнаружения

возбудителя ящура в продуктах убоя метод ПЦР не уступает методу вирусовыделения с помощью культуры клеток, а по скорости получения результатов превосходит его. Установлено, что в слизистой оболочке языка, лимфатических узлах, костном мозге, подкожном жире, легких и миндалинах в период созревания мяса вирус ящура не теряет своей активности. В пробах мышц вирус ящура не выделен, а отсутствие вирусного генома возможно связано с влиянием тканевой нуклеазы на РНК вируса.

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование динамики изменения рН в процессе созревания продуктов убоя свиней, экспериментально зараженных вирусом ящура. Показана эффективность обнаружения возбудителя ящура в тканях и органах свиней с применением метода ПЦР и вирусовыделения в культуре клеток.

ABSTRACT

The pH dynamics during the maturation of slaughter products from FMDV experimentally infected swine was examined. The effectiveness of FMDV detection in swine tissues and organs using PCR and virus isolation in a cell culture was demonstrated.

Литература

1. Под ред. А.Н. Бурдова. Ящур. М.: Агропромиздат, 1990. С. 320.
2. МЭБ. Санитарный кодекс наземных животных. 14 изд. Париж, 2005. С. 114–126.
3. O.I.E. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2004. V. 1. P. 110–118.
4. Методические указания по выявлению и идентификации штаммов вируса ящура: утв. Департаментом Ветеринарии МСХ РФ 10.11.02.
5. Методические указания по индикации генома вируса ящура с помощью полимеразной цепной реакции на основе амплификации консервативной области 3D гена: утв. Департаментом Ветеринарии МСХ РФ 21.02.97.
6. А.А. Гусев, В.М. Захаров, А.М. Рахманов, Н.А. Яременко. Профилактика ящура в Российской Федерации // Ветеринария. 2001. № 5. С. 3–5.
7. А.А. Гусев, В.М. Захаров, Т.А. Фомина, А.В. Щербаков. Биологические свойства вируса ящура типа O/1685/“Московский”, выделенного у свиней // Сучасні ветеринарні та технологічні аспекти свинарства: мат. конф. Киев, Україна, 2002. С. 9–10.

УДК 619:578.835.2:57082.26

Н.Д. Клюкина, В.В. Михалишин, Т.Н. Лезова

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ВИРУСА ЯЩУРА С ПОМОЩЬЮ ПОЛИАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Введение

В результате репродукции вируса в культуре клеток ВНК-21 в вирусосодержащей суспензии содержится не только вирус, но и балластные белки, количество которых влияет на качество вакцин. Применение вакцин из такого материала приводит к возникновению у КРС аллергических реакций [5]. С целью уменьшения реактогенности вакцин проводят очистку от примеси балластных белков.

Для повышения содержания специфического антигена в вакцинах применяют различные методы концентрирования вирусосодержащих суспензий с использованием метода сорбции вируса или антигена на

сорбенты, метода осаждения полиэтиленгликолем и проточной ультрафильтрации.

Метод сорбции вируса ящура на гель ГОА обеспечивает концентрирование вируса более чем на 90% и зависит от количества вносимого сорбента [1, 2, 3]. Основным условием метода концентрирования является высокая сорбционная емкость ГОА и наименьшие потери иммуногенных компонентов (146S+75S).

При изучении сорбции белков сорбентами, такими, как ГОА, фосфат алюминия, фосфат кальция, установлено, что в первую очередь адсорбировались высокомолекулярные белки. Следовательно, адсорбционная специфичность минеральных

сорбентов при их внесении в вирусосодержащую суспензию характеризуется, главным образом, размерами частиц или молекул белка, а не их биохимическими свойствами. Установлено, что качество очистки суспензии от балластных белков пропорционально количеству добавленного сорбента и количеству балластных примесей в суспензии [4].

Целью нашей работы было исследование очистки и концентрирования культурального вируса ящура при помощи ГОА с последующей элюцией полиакриловой кислотой (ПАК).

Материалы и методы

В работе использовали культуральный вирус ящура (КВЯ) типов А № 1707 Армения-98, О₁ № 194, Азия-1 Иран 58/99. Суспензию КВЯ очищали добавлением хлороформа и полигексаметиленгуанидина, которую центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Для приготовления концентрированных антигенов использовали исходную инактивированную аминоктилэтиленмином вирусную суспензию. В очищенную суспензию добавляли 3%-й гель ГОА в концентрации 0,10; 0,20; 0,30% к объему. Смесь шуттелировали в течение 30 мин. и хранили при +2–8° С в течение 12–24 часов. Затем центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. и проводили исследование надосадочной жидкости на инфекционную активность, содержание общего вирусного (ОВБ) и балластного белка. Элюцию вируса и антигена проводили с помощью 0,5%-го раствора ПАК (рН 7,2). В качестве контрольного элюирующего раствора использовали 1/3М фосфатно-буферный раствор (ФБР) (рН 7,3). Инактивированные 10-кратные концентрации разводили в 10 раз ФБР и определяли

общий вирусный белок (ОВБ).

Элюаты с ПАК использовали для изготовления эмульсионных вакцин с адьювантом ISA-70 в соотношении 30:70. Иммуногенную активность эмульсионных вакцин испытывали на свиньях путем установления 50%-й иммунизирующей дозы. Животных вакцинировали внутримышечно цельной вакциной и разведениями 1:5 и 1:25. Прививная доза (2 мл) содержала не менее 4 мкг иммуногенных компонентов (146S+75S).

Контрольное заражение вакцинированных животных проводили на 19 день после вакцинации (ДПВ) путем введения в слизистую языка 10⁴ИД₅₀, адаптированного к свиньям вируса, гомологичного вакцинному. Гуморальный иммунитет определяли в реакции нейтрализации против 100 ТЦД₅₀, титры вируснейтрализующих антител (ВНА) рассчитывали по методу Риды и Менча и выражали в log₂.

Результаты собственных исследований

В начале работы определили оптимальную концентрацию ГОА для адсорбции. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Анализ результатов таблицы 1 показал, что концентрация ГОА в количестве 0,30% наиболее полно адсорбирует вирус.

При проведении сорбции мы исследовали в надосадочной жидкости количество растворимых белков с помощью спектрофотометра (СФ-26, длина волны 280 нм). Результаты очистки культурального вируса ящура при сорбции представлены в таблице 2.

Представленные в таблице 2 данные показали удаление 84–87% балластных белков с надосадочной жидкостью.

В следующей серии опытов адсорбировали инактивированный вирус ящура 0,3%

Таблица 1
Определение оптимальной концентрации ГОА для адсорбции вируса ящура типа О (n=4)

№ п/п	Концентрация ГОА в суспензии (%)	Характеристика надосадочной жидкости		Процент потерь по	
		титр инфекционной активности lg ТЦД ₅₀ /0,1мл	ОВБ, мкг/мл	инфекционной активности	ОВБ
1	0,1	5,53±0,19 p<0,001	1,53±0,26 p<0,01	10,18±2,7607 p<0,005	49±2,7607 p<0,001
2	0,2	4,42±0,20 p<0,001	0,03±0,02 p<0,001	1,08±0,0548 p<0,001	0,95±0,0147 p<0,001
3	0,3	2,75±0,17 p<0,001	0,006±0,007 p<0,01	0,01±0,0009 p<0,005	0,2±0,0147 p<0,001
4	Контроль исходной суспензии	6,95±0,12 p<0,001	3,15±0,28 p<0,005	-	-

Очистка культурального вируса ящура с помощью адсорбции (n=4)

№ п/п	Концентрация ГОА в суспензии (%)	Кол-во растворимых удаляемых белков с надосадочной жидкостью (мг %)	Процент очистки от балластных белков
1	0,1	480±29,12 p<0,001	84±1,03 p<0,001
2	0,2	490±20,09 p<0,001	85±2,31 p<0,001
3	0,3	500±23,52 p<0,001	87±1,13 p<0,001
4	Контроль исходная суспензия	572±25,61 p<0,001	-

концентрацией ГОА (рН-7,2) и элюировали полиакриловой кислотой. Готовили 10-кратные концентраты по объему. Контролем служила элюция с помощью 1/3 М ФБР. Результаты изложены в таблице 3.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что вирус ящура успешно элюируется с сорбента с помощью ПАК, потери составили от 0 до 34% по общему вирусному белку. Потери с использованием контрольного раствора 1/3 М ФБР были от 17 до 49%.

Концентраты, полученные методом элюции раствором ПАК, использовали для изготовления эмульсионных вакцин.

Результаты определения иммуногенной активности вакцин для свиней представлены в таблице 4.

Контрольная вакцина была изготовлена из концентрата, полученного методом ультрафильтрации.

Данные, представленные в таблице 4, свидетельствуют о том, что иммуногенная активность вакцины из концентрированного антигена, полученного методом «сорбции-элюции», аналогична контро-

ному образцу. Титры ВНА у животных после иммунизации опытной и контрольной вакцинами были одинаковыми при иммунизации цельной вакциной и составляли 5,0±0,38 и 4,5±0,94 соответственно. Животные, привитые разведениями опытной вакцины 1:5 и 1:25, имели в 2 раза более высокие титры ВНА на 10 день после вакцинации (6,20±0,76 и 5,53±0,55) по сравнению с титрами ВНА, индуцированными контрольной вакциной (4,20±0,38 и 3,60±0,39). Такая существенная разница в титрах ВНА объясняется присутствием в опытной вакцине иммуномодулятора ПАК. С 10 по 19 день после вакцинации наблюдали увеличение количества ВНА у животных, привитых как опытной, так и контрольной вакцинами.

Обсуждение результатов исследований

По многочисленным исследованиям, очистка и концентрирование необходимы для улучшения качества вакцин и уменьшения побочных реакций при ее введении [1, 2, 3]. Мы определили в своей работе, что при адсорбции неинaktivированного и инаktivированного вируса на ГОА с над-

Таблица 3

Результаты концентрирования вируса «сорбцией-элюцией» с помощью ПАК

№ п/п	Тип вируса	Кратность концентрирования	Элюирующий раствор	Кол-во ОВБ (мкг/мл)	Потери (%)
1	Азия-1	0	Исходная суспензия	1,94	-
		10	1/3 М ФБР	1,31	32
			ПАК	2,04	-
2	О	0	Исходная суспензия	1,95	-
		10	1/3 М ФБР	1,0	49
			ПАК	1,28	34
3	А	0	Исходная суспензия	2,16	-
		10	1/3 М ФБР	1,8	17
			ПАК	1,63	25

Иммуногенная активность вакцины против ящура типа О для свиней

№ п/п	Содержание компонентов в прививной дозе	Метод концентрирования антигена	Разведения вакцины	Титры ВНА, log ₂		Кол-во защищенных свиней	ИмД ₅₀ (мл)
				10 ДПВ	19 ДПВ		
1	0,16 мкг 146+75S 1968 мг ISA-70 0,6 мг ПАК	сорбция-элюция	1:25	5,53±0,55 p<0,001	6,80±0,85 p<0,005	5/5	0,04
	0,8 мкг 146+75S 1840 мг ISA-70 3 мг ПАК		1:5	6,20±0,76 p<0,001	7,15±0,74 p<0,001	5/5	
	4 мкг 146+75S 1200 мг ISA-70 15 мг ПАК		ц	5,00±0,38 p<0,001	5,55±0,47 p<0,001	5/5	
2	0,16 мкг 146+75S 1968 мг ISA-70	ультра-филтрация	1:25	3,60±0,39 p<0,001	6,15±0,46 p<0,001	5/5	0,05
	0,8 мкг 146+75S 1840 мг ISA-70		1:5	4,20±0,38 p<0,001	5,22±0,70 p<0,001	4/5	
	4 мкг 146+75S 1200 мг ISA-70		ц	4,50±0,94 p<0,025	4,62±0,70 p<0,001	4/4	

*числитель — количество защищенных животных после контрольного заражения, знаменатель — количество животных, взятых в опыт

сачочной жидкостью удаляется 87% балластных белков.

При проведении опытов мы испытали метод элюции с помощью раствора ПАК. Известным методом элюции антигена вируса ящура является 1/3 М ФБР (Matheka H.D. 1959). Проведенные исследования показали, что потери вирусспецифического белка при концентрировании методом «сорбции-элюции» в 1,4 раза меньше, чем при концентрировании 1/3 М фосфатно-буферным раствором. Это указывает, что 0,5%-й раствор ПАК является эффективным элюирующим средством вируса ящура с сорбента ГОА.

Эмульсионные вакцины, приготовленные из концентрированных антигенов, полученных методом «сорбции-элюции», по-

казали высокую иммуногенную активность в остром опыте на свиньях.

Закключение

Для очистки и концентрирования с помощью сорбции оптимальной концентрацией ГОА является 0,3%. Очистка при указанной концентрации удаляет 87% балластных примесей.

ПАК в концентрации 0,5% успешно элюирует вирус ящура с сорбента ГОА.

Концентрирование антигена методом «сорбции-элюции» пригодны для приготовления эмульсионных противоящурных вакцин.

Приготовленная опытная вакцина была авирулентна, безвредна, стерильна и со-держала в прививном объеме 50 РД₅₀.

РЕЗЮМЕ

Проведены исследования по определению оптимальной концентрации гидроокиси алюминия (ГОА) для сорбции культурального вируса ящура. Концентрированные антигены, полученные с помощью элюирующего раствора полиакриловой кислоты (ПАК) методом «сорбции-элюции», пригодны для изготовления иммуногенных противоящурных вакцин.

SUMMARY

The optimal concentration of aluminum hydroxide for the absorption of the FMD cultural virus was investigated. Concentrated antigens prepared by the “sorption-elution” method using the eluting polyacrylic acid solution are suitable for the immunogenic FMD vaccines.

Литература

1. А.И. Абдулов, А.Я. Самуйленко, Н.Д. Скичко, В.И. Еремец. Безаммиачный гель гидроокиси алюминия для противоящурных вакцин // Науч. основы технологии пром. произ-ва вет. биол. prep.: тез. докл. 3 Всесоюз. конф. М., 1987. С. 159–160.

2. А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев. Адьюванты. М.: Медицина, 1969. 206 с.

3. Н.К. Еремец. Оценка качества алюмогидрогеля на

уровне тонкой структуры // Передовой науч.-произв. опыт в биол. пром-ти. М., 1984. № 11. С. 10–12.

4. И.В. Черняховская. Изучение закономерностей сорбции белков сорбентами биопрепаратов // Адьюванты в вакцинно-сывороточном деле. М., 1975. С. 132–135.

5. A. Kast. Spätallergien nach MKS-Impfung // Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1970. № 3. S. 70.