

УДК 619:578.835.2:57082.26

Н.Н. Ходакова

ОЧИСТКА КУЛЬТУРАЛЬНОГО ВИРУСА ЯЩУРА ТИПА АЗИЯ-1 ПОЛИГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНИДИНОМ

Введение

Очистка вирусосодержащей суспензии является неотъемлемой частью технологического этапа изготовления инактивированных противоящурных вакцин. Она имеет большое значение, так как удаление балластных белков увеличивает разрешающую способность метода адсорбции и снижает реактогенность вакцины, которая может приводить к развитию аллергических реакций у привитых животных [3].

Основным требованием, предъявляемым к методу очистки, является эффективное удаление балластных белков при минимальных потерях вирусного антигена [3].

В настоящее время при производстве противоящурных инактивированных вакцин в ФГУ ВНИИЗЖ для флокуляции балластных белков применяют полигексаметиленгуанидин [1, 2].

Культуральный вирус с высокой степенью очистки эффективно концентрируется методом ультрафильтрации.

Целью работы было подобрать оптимальную концентрацию полигексаметиленгуанидина для очистки культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 от балластных белков с сохранением 146S+75S компонентов, его инфекционной активности и получения из очищенного антигена высокоиммуногенной вакцины.

Материалы и методы

Для работы использовали культуральный вирус ящура типа Азия-1 Иран 58/99, репродуцированный в суспензионной культуре клеток ВНК-21/2-17.

Инактивацию вируса проводили аминоксилотамином (АЭЭИ) в количестве 0,05% в течение 12 часов при 37° С.

Авирулентность инактивированного аминоксилотамином антигена контролировали на культуре первично трипсицинизированных клеток почки свиньи (СП).

Очистке подвергали вирусосодержащую суспензию до и после инактивации.

Для очистки использовали полигексаметиленгуанидин в конечной концентрации 0,005; 0,01; 0,02%.

Полигексаметиленгуанидин в суспензию вносили при температуре 37° С, с последующим охлаждением до 10–15° С в те-

чение 2 часов.

Титрование инфекционности культурального вируса ящура проводили на культуре клеток СП. Содержание растворенного балластного белка определяли с помощью спектрофотометра (СФ-26, длина волны 280 нм).

Определение 146S+75S компонентов проводили количественным методом РСК, иммуногенную активность образцов вакцин исследовали на морских свинках и выражали в 50% иммунизирующих дозах (ИмД₅₀ МС).

Результаты исследований

Качество очистки суспензии культурального вируса ящура полигексаметиленгуанидином проверяли, используя суспензии с различным содержанием балластных белков. Результаты исследований приведены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что увеличение концентрации полигексаметиленгуанидина позволяло повысить качество очистки суспензии культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99. Количество балластных белков при обработке суспензии полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,01% и 0,02% уменьшалось в сравнении с исходным в 1,3–1,4 раза.

В следующих опытах изучали влияние полигексаметиленгуанидина на инфекционные свойства вируса ящура.

Результаты опытов (таблица 2) показали, что обработка суспензии вируса полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,02% приводит к снижению его инфекционной активности. В сравнении с титром вируса в неочищенной суспензии, при обработке полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,02%, титр инфекционности снизился в 4,6 раза. Полигексаметиленгуанидин в концентрации 0,005% не оказывал влияния на инфекционную активность вируса.

Главным критерием оценки способа очистки вируса являются показатели его иммуногенной активности (выражаемой в сохранности 146S+75S компонентов) и стабильности этого свойства при хранении вакцины.

Данные, представленные в таблице 3, показали, что количество иммуногенных

Очистка суспензии культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 с различным содержанием балластных белков полигексаметиленгуанидином

Таблица 1

до очистки	Количество растворенных белков (мг%) в суспензии		
	очищенной ПГ в концентрации (%)		
	0,005	0,01	0,02
614±22,6 n=10 p<0,001	526±54,9 n=10 p<0,001	471±33,3 n=10 p<0,001	470±8,7 n=4 p<0,001
307±14,5 n=3 p<0,005	257±8,8 n=3 p<0,005	213±3,3 n=3 p<0,001	220±10,8 n=3 p<0,005

Влияние концентрации ПГ на инфекционную активность вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99

Таблица 2

Тип вируса	Титр инфекционности вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл) в суспензии, обработанной ПГ в концентрации (%)			
	до очистки	0,005	0,01	0,02
Азия-1 Иран 58/99	7,23	7,25	7,0	6,6
	7,50	7,50	7,5	7,0
	6,63	6,50	6,5	6,0
	7,67	7,77	7,25	6,77
	7,25	7,0	6,75	6,5
M±m	7,26±0,1766 p<0,025	7,20±0,2176 p<0,025	7,0±0,1768 p<0,025	6,6±0,1666 p<0,025

(146S+75S) компонентов вируса ящура в суспензии, обработанной полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,02%, ниже по сравнению с необработанной суспензией в 1,3 раза, а при обработке полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,005% и 0,01% было одинаковым и от неочищенной суспензии не отличалось.

Результаты, представленные в таблице 4, показывают, что, иммуногенность вакцин, изготовленных из антигена, очищенного полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,02%, в 1,4 раза ниже, чем из неочищенного антигена. Активность вакцин, приготовленных из антигена, очищенного полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,005% и 0,01%, от вакцин из неочищенного антигена не отличается.

Приготовленные вакцины хранились в течение 12 месяцев при температуре 2–8° С, после чего определяли их иммуногенную активность на морских свинках.

Данные, представленные в таблице 5, показали, что иммуногенная активность вакцин, приготовленных из антигена, очищенного полигексаметиленгуанидином в концентрации 0,005% и 0,01%, в течение 12 месяцев находилась в пределах исходного значения. Полигексаметиленгуанидин в концентрации 0,02% разрушал антиген в процессе хранения, и иммуногенность его снижалась в 2 раза по сравнению с таковой до хранения.

Обсуждение результатов исследований

Полигексаметиленгуанидин, используемый для очистки вирусосодержащей суспензии при производстве противоящурных вакцин, обладает флокулирующими, а также стерилизующими свойствами.

Авторы, проводившие исследования, отмечали, что увеличение концентрации полигексаметиленгуанидина уменьшает количество содержащихся балластных белков в вирусосодержащей суспензии, но

Влияние концентрации ПГ на иммуногенные (146S+75S) компоненты вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99

Таблица 3

Тип вируса, штамм	Количество 146S+75S компонентов вируса (мкг/мл) в суспензии, обработанной ПГ в концентрации (%)			
	до очистки	0,005	0,01	0,02
Азия-1 Иран 58/99	1,56	1,61	1,56	1,0
	1,80	1,80	1,71	1,3
	1,70	1,67	1,62	1,35
	1,80	1,79	1,75	1,41
M±m	1,72±0,5668 p<0,025	1,72±0,0464 p<0,01	1,66±0,0430 p<0,01	1,27±0,0912 p<0,025

Таблица 4

Иммуногенная активность сорбированных вакцин, изготовленных из антигена, очищенного ПГ

Характеристика вакцины	ИмД ₅₀ МС вакцин, изготовленных из антигена, очищенного ПГ			
	до очистки	0,005%	0,01%	0,02%
Сорбированная вакцина с сапонином	0,031 0,030 0,035	0,032 0,029 0,03	0,037 0,035 0,03	0,041 0,05 0,045
M±m	0,032±0,0015 p<0,001	0,030±0,0009 p<0,01	0,034±0,0021 p<0,001	0,045±0,0026 p<0,001

Таблица 5

Сохранность антигена вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99, обработанного ПГ (n=3)

Время хранения	ИмД ₅₀ МС вакцин, изготовленных из антигена, очищенного ПГ, после хранения			
	до очистки	0,005%	0,01%	0,02%
1 месяц	0,032±0,0015 p<0,001	0,030±0,0009 p<0,01	0,034±0,0021 p<0,001	0,045±0,0026 p<0,001
12 месяцев	0,030±0,0006 p<0,01	0,034±0,0015 p<0,001	0,04±0,0015 p<0,001	0,09±0,0068 p<0,005

снижает и инфекционную активность вируса ящура, разрушает его иммуногенные компоненты (146S+75S), при этом также снижается иммуногенность полученной вакцины [1, 2, 3].

Нами были проведены исследования по влиянию полигексаметиленгуанидина на инфекционную активность, количество иммуногенных компонентов культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 и иммуногенность вакцин, приготовленных из этого штамма, в том числе и в процессе хранения. При использовании полигексаметиленгуанидина для очистки культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 отметили, что обработка ПГ в концентрации 0,02% снижает инфекционную активность вируса, уменьшает количество иммуногенных компонентов (146S+75S), а также иммуногенную активность приготовленной вакцины в 2 раза в процессе хранения при температуре 2–8° С в течение 1 года с момента изготовления.

Обработка суспензии вируса полигексаметиленгуанидином в концентрации

0,005% и 0,01% сохраняет инфекционную активность вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 и количество иммуногенных (146S+75S) компонентов; иммуногенность вакцины, приготовленной из этих антигенов, не отличается от активности вакцин, приготовленных из неочищенного антигена, и в процессе хранения не изменяется. При производстве противоящурных вакцин очистка вирусосодержащей суспензии от балластного белка играет важную роль при концентрировании антигена как методом сорбции, так и ультрафильтрации.

Заключение

Результаты проведенных исследований показали, что использование для очистки культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99 полигексаметиленгуанидина в концентрации 0,005% и 0,01% является оптимальным, так как при удалении балластных белков сохраняются инфекционная активность, количество иммуногенных компонентов культурального вируса, а также иммуногенность полученных из него вакцин.

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты исследования влияния полигексаметиленгуанидина (ПГ), использованного для очистки суспензии культурального вируса ящура типа Азия-1 Иран 58/99, на его инфекционную активность и количество иммуногенных компонентов (146S+75S), а также на иммуногенность инактивированного вируса в составе сорбированной вакцины после изготовления и через 12 месяцев хранения.

SUMMARY

The influence of the polyhex-methylen-aminoethanamidine used for the purification of the FMD Asia-1 Iran 58/99 virus reproduced in the suspended BHK-21/2-17 cell culture was investigated. Its impact on the virus infectivity, on the number of immunogenic components (146S+75S), on the immunogenicity of the purified and inactivated virus in the composition of the sorbated vaccine as well as on its stability during storage was also examined.

Литература

1. Т.Н. Лезова, В.В. Михалишин, Д.В. Михалишин, Н.Д. Клюкина. Влияние полигексаметиленгуанидина на вирус ящура // Акт. пробл. инфекц. па-

тологии ж-ных: Матер. Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ. Владимир, 2003. С. 401–403

2. Т.Н. Лезова, В.В. Борисов, Н.А. Улупов, В.В. Михалишин. Очистка вируса ящура водорастворимым полимером // Вирусные и микробные болезни ж-ных: Сб. науч. трудов. Владимир, 1995. С. 226–232

3. Т.Н. Лезова., Н.А. Улупов, В.В. Борисов и др. Пат. 2054039 Российская Федерация, МПК⁶ С 12 N 7/02. Способ очистки и стерилизации культурального вируса ящура / Заявитель ВНИИЗЖ. Заявл. 07.02.92; опубл. 10.02.96, Бюл. № 4. 1 с.

УДК 619:578.835.2:616-085.371

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

РОЛЬ АДЪЮВАНТОВ В ПРОТИВОЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЕ ДЛЯ ЭКСТРЕННОЙ ЗАЩИТЫ

Введение

Ящур является наиболее значимым заболеванием парнокопытных животных, которое распространено во многих странах мира и наносит серьезный экономический ущерб животноводству.

Наиболее эффективная стратегия борьбы с ящуром — убой зараженных и контактировавших с ними животных. Но такая политика требует истребления большого количества восприимчивых животных, создает трудности с утилизацией трупов, характеризуется потерей ценного генетического материала и резким сокращением поголовья на конкретной территории. Поэтому самым прагматичным подходом в борьбе с ящуром является вакцинация, которая может использоваться в различных сочетаниях [2]. Для специфической профилактики этого заболевания широко применяют моно- и поливалентные вакцины из инактивированного культурального вируса ящура. Однако, иммуногенная активность противоящурных вакцин зависит не только от количества и качества используемого антигена и технологии получения препарата, но и от правильного выбора неспецифических иммуностимуляторов.

Быстрое развитие иммунитета считается идеальным свойством инактивированной вакцины.

Динамика нарастания иммунитета у восприимчивых животных в зоне вспышки будет служить барьером для вируса, приведет к сдерживанию инфекции и ее купированию в первичном очаге. Желательно, чтобы защита обеспечивалась быстро и затем сохранялась достаточно долго, не требуя ревакцинации [1, 3, 4].

Целью работы было подобрать адъювант для создания иммунитета у КРС и свиней, способного защитить животных в первые дни после вакцинации против гомологичного вируса ящура.

Материалы и методы

В опытах использовали моновалентную сорбированную вакцину с сапонином из культурального вируса ящура Азия-1 Иран 58/99 с содержанием 146S+75S компонентов в количестве 31,9 мкг, 24 мг ГОА и 1,5 мг сапонины в прививной дозе 2 мл — вакцина № 1.

Вакцина № 2 — вакцина № 1, смешанная 1:1 с адъювантом Montanide ISA-206 с образованием эмульсии вода–масло–вода.

Вакцина № 3 — вакцина № 1, смешанная 1:1 с раствором полиакриловой кислоты (ПАК), рН 7,5, М.м. 800000 Д.

Подсвинки массой 40–50 кг и крупный рогатый скот (КРС) — 250–300 кг. Свиньям вакцину вводили внутримышечно, КРС — подкожно.

Контрольное заражение КРС проводили через 4 дня после вакцинации путем введения в слизистую оболочку языка афтозного вируса Азия-1 Иран 58/99 в дозе 10^4 ИД₅₀/0,2 мл.

Учет результатов проводили через 7 дней после заражения.

Гуморальный иммунитет у свиней определяли в реакции нейтрализации через 3, 7, 10 дней после вакцинации (ДПВ) против 100 ТЦД₅₀ вируса, титры вируснейтрализующих антител (ВНА) рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в log₂.

Результаты исследований

Исследования были проведены для определения формирования раннего иммунитета на введение вакцины, содержащей различные адъюванты с использованием контрольного заражения гомологичным вирусом ящура.

Анализ результатов, представленных в табл. 1, показал, что скорость развития иммунитета после инъекции вакцины №1 была высокой уже через 3 ДПВ, и уровень ВНА увеличивался к 10 дню после вакцинации.