

DOI: 10.26104/NNTIK.2022.17.73.029

Эркинова З.Э., Джапаралиев Н.Т.

ВАКЦИНАЛАРДЫ ӨНДҮРҮҮДӨ ШТАММДАРДЫ ИНАКТИВАЦИЯЛОО РЕЖИМИН ОПТИМАЛДАШТЫРУУ

Эркинова З.Э., Джапаралиев Н.Т.

ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА ИНАКТИВАЦИИ ШТАММОВ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ВАКЦИН

Z. Erkinova, N. Djarparaliev

OPTIMIZATION OF THE STRAIN INACTIVATION MODE IN THE MANUFACTURE OF VACCINES

УДК: 619:616.98:578.835.2-085.371:636.22/28

Айыл чарба жаныбарларынын шарт оорусуна каршы вакцинасын өндүрүүдө штаммдарды инактивациялоо режимин оптималдаштыруу үчүн шарт вирусунун А №17 (Кыргызстан-2021) жана О₁ (Тайвань) штаммдары колдонулду. Суспензиялык клетка культурсында өстүрүлгөн А№17 (Кыргызстан-2021) жана О₁ (Тайвань) штаммдары аминоэтилэтиленмин (АЭЭИ) менен инактивация болуп андан соң 24 сааттык туруктуу инактивациялоо убактысында инкубациялоо температурасына жараша АЭЭИнин вирустук активдүүлүгү салыштырылды. Жана ошондой эле АЭЭИдин вирустук активдүүлүгү инактивация убактысына жараша 37°C туруктуу температурада сыналды. Мындан тышкары вирус камтыган суспензияны өнөр жайлык шартта тазалоо үчүн хлороформ реagenти колдонулду. Вирусту тазалоо үчүн биздин эксперименттерде хлороформдон тышкары жогорку молекулярдык полигуанидин (полигексометиленгуанидин) колдонулду, бул культуралдык вирусту тазалоонун сапатын жакшыртууга мүмкүндүк берет. МЦ вирус камтыган суспензиясы инактивациядан мурун тазаланган.

Негизги сөздөр: вирус, штамм, шарт, клетка культурасы, оптимизациялоо, вирулицидик активдүүлүк, тазалоо, инактивация, суспензия.

Для оптимизация режима инактивации штаммов при изготовлении вакцин использовали вирус ящура шт. А№17 (Кыргызстан-2021) и О₁ (Тайвань), выращенный в суспензионной культуре клеток, который инактивировали аминоэтилэтиленмином (АЭЭИ) и было проведено сравнение штаммов А№17 (Кыргызстан-2021) и О₁ (Тайвань) на вирулицидную активность АЭЭИ в зависимости от температуры инкубации при постоянном времени инактивации 24 часа. А также, была испытана вирулицидная активность АЭЭИ при температуре 37°C в зависимости от времени инактивации. Кроме того, проведена очистка вирусодержащей суспензии в промышленных условиях, которой reagentом является хлороформ. Наряду с хлороформом для очистки вируса в наших опытах использовали высокомолекулярный полигуанидин (полигексометиленгуанидин), позволяющий повысить качество очистки культурального вируса. Очистку вирусодержащей суспензии МЦ проводили перед инактивацией.

Ключевые слова: вирус, штамм, ящур, культура клеток, оптимизация, вирулицидная активность, очистка, инактивация, суспензия.

To optimize the mode of inactivation of strains in the manufacture of vaccines used foot-and-mouth disease virus А№17 (Kyrgyzstan-2021) and О₁ (Taiwan) grown in suspension cell culture, which was inactivated with aminoethyl ethyleneimine (AEEI), and strains А№17 (Kyrgyzstan-2021) and О₁ (Taiwan) were compared

for the virucidal activity of AEEI depending on the incubation temperature at a constant inactivation time of 24 hours. And also, the virucidal activity of AEEI was tested at a temperature of 37°C, depending on the time of inactivation. In addition, a virus-containing suspension was purified under industrial conditions, the reagent being chloroform. In addition to chloroform, high molecular weight polyguanidine (polyhexomethyleneguanidine) was used in our experiments to purify the virus, which makes it possible to improve the quality of purification of the cultural virus. The virus-containing suspension of MC was purified before inactivation.

Key words: virus, strain, foot and mouth disease, cell culture, optimization, virucidal activity, purified, inactivation, suspension.

Ящур – остро протекающее, чрезвычайно контактно-зoonозное заболевание всех видов сельскохозяйственных и диких парнокопытных животных. Болезнь развивается циклически с образованием характерных пузырьков (афт) и эрозий на слизистой оболочке ротовой полости, а также на отдельных участках кожи – вымя, межкопытная щель, венчик, мякиши [1].

Возбудителем является вирус ящура (ВЯ), безоболочечный РНК-вирус, относящийся к роду Aphthovirus семейства Picornaviridae [4].

Характеризуется высокой степенью болезнетворности и дерматотропностью (средством по отношению к коже). По антигенной структуре подразделяется на 7 серотипов, в каждом из которых различают несколько антигенных вариантов, различающихся географической зоной распространения и относительной избирательностью видов животных. Болезнь регистрируется во многих странах мира. Серотипы А, О, С распространены широко; тип Азия 1 выявлен только в азиатских странах; серотипы SAT 1, SAT 2, SAT 3 регистрировались в странах Африки, однако в 1961-1962 гг. SAT 1 появился в странах Среднего Востока и Турции [2].

Период инкубации составляет 2-14 дней у КРС и мелких жвачных животных, и обычно короче у свиней (1-2 дня). Типичными клиническими признаками являются лихорадка, угнетенное состояние и снижение выработки молока у молочных животных, после чего в течение суток происходит разрыв множественных везикул, локализованных на конечностях (межпальцевое пространство, копыта),

морде, в ротовой полости (язык и десны) и вымени. Везикулы быстро разрываются и превращаются в язвы, вызывающие боль, анорексию, гиперсаливацию, слюнотечение, хромоту и отказ от ходьбы [3].

Целью исследований было сравнить вирулицидную активность АЭЭИ штаммов А№17 (Кыргызстан-2021) и О₁ (Тайвань) в зависимости от температуры при постоянном времени инактивации 24 часа, а также при температуре 37°C в зависимости от времени инактивации.

Материалы и методы. Вирусный материал и подопытные животные.

Штаммы вируса ящура. Экспериментальную работу проводили с использованием следующих типов и штаммов вируса ящура:

– культуральный вирус ящура О₁№194, О₁ (Тайвань), А₂₂№550, А№17 (Кыргызстан - 2021), репродуцированные в суспензии клеток ВНК-21, 5-6 пассажей каждый.

При проверке активности вакцин на морских свинках использовали адаптированные к ним штаммы вируса О₁№194, А₂₂№550.

При проверке активности вакцин на овец использовали адаптированные к овцам вирусы О₁№194, А₂₂№550, А№17 (Кыргызстан – 2021), О₁ (Тайвань).

Подопытные животные. В опытах использовали следующих животных:

- морских свинок, массой 450-500г для контроля иммуногенности вакцин;
- КРС не моложе 18 месяцев, массой не менее 250 кг из благополучных по ящуру зон страны, где в течении последних двух лет не проводили вакцинацию против ящура;
- овец местной породы, массой 30-50 кг из благополучных по ящуру зон.

Приготовление суспензий вирусосодержащего материала. Суспензию клеток после замены росто-

вой среды заражали посевным вирусом из расчета 0,5-0,001 ТЦД₅₀ на клетку. Время инкубации составляло 10-19 часов. При гибели 90-95% клеток в рубашку культиватора подавали хладогент и охлаждали суспензию до 4-6°C.

Очистка вирусосодержащих суспензий. Вирусосодержащую суспензию культурального вируса очищали с помощью МЦ в конечной концентрации 0,007-0,02% с добавлением 0,2% хлороформа и эту смесь отстаивали для седиментации флокулированных белков в течении 24-48 часов. Надосадочную жидкость использовали в работе.

Концентрирование вируса и антигена. Концентрирование антигена осуществляли сорбцией на аэросиле, ГОА, полиэтиленгликоле и ультрафильтрацией.

Результаты проведенных исследований. При изготовлении противоящурных вакцин использовали различные методы инактивации вируса.

Данные литературы по инактивации вируса азиридинами свидетельствуют о том, что эти вещества инактивируют инфекционность по реакции первого порядка без существенного повреждения иммуногенных свойств вируса.

В наших опытах использовали вирус ящура шт. А№17 (Кыргызстан-2021) и О₁ (Тайвань), выращенный в суспензионной культуре клеток, который инактивировали аминоэтилэтиленимином (АЭЭИ). Сравнивали вирулицидную активность АЭЭИ в зависимости от температуры инкубации при постоянном времени инактивации 24 часа.

Данные таблицы 1 показывают, что с увеличением температуры инактивации до 37°C вирулицидная активность АЭЭИ увеличилась для вируса ящура О₁ (Тайвань) в 4 раза, а для вируса А№17 (Кыргызстан-2021) в 3,9 раза. Существенных различий инактивирующего действия испытанных концентраций для различных типов вируса ящура не обнаружено.

Таблица 1

Влияние температуры инактивации на вирулицидную активность АЭЭИ

| Температура инактивации (°C) | K50 (%) | |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | О ₁ (Тайвань) | А№17 (Кыргызстан-2021) |
| 36-37 | 0,0005 | 0,0004 |
| | 0,0012 | 0,0012 |
| | 0,0009 | 0,0008 |
| M+m | 0,0009±0,0002 p<0,050 | 0,0008±0,0002 p<0,050 |
| 27-28 | 0.0050 | 0.0035 |
| | 0.0030 | 0.0050 |
| | 0.0029 | 0.0040 |
| M+m | 0,0036±0,0007 p<0,025 | 0,0031±0,0009 p<0,050 |

Кроме того, нами была испытана вирулицидная активность АЭЭИ при температуре 37°C в зависимости от времени инактивации. Данные опытов приведены в таблице 2.

Таблица 2

| Время инактивации (ч) | К50 (%) | |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| | O ₁ (Тайвань) | A№17 (Кыргызстан-2021) |
| 24 | 0,0015 0,0008 0,0011 | 0,0014 0,0009 0,0012 |
| M+m | 0,0015±0,0001 p<0,010 | 0,0012±0,0001 p<0,010 |
| 12 | 0,0027 0,0030 0,0025 | 0,0031 0,0030 0,0025 |
| M+m | 0,0027±0,0001 p<0,010 | 0,0029±0,0001 p<0,010 |

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что с увеличением времени инактивации при постоянной температуре вирулицидная активность АЭЭИ возрастала для типа O в 1,8 раза, а типа A в 2,4 раза.

Оптимизация условия очистки вирусосодержащей суспензии. Основным реагентом при очистке в промышленных условиях вирусосодержащих суспензий вируса ящура остается хлороформ. Наряду с хлороформом для очистки вируса в наших опытах был использован высокомолекулярный

полигуанидин (полигексометиленгуанидин), позволяющий повысить качество очистки культурального вируса. Результаты проведенных в этом направлении опытов представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 показывают, что увеличение концентрации МЦ от 0,001% до 0,0075% не снизило титр инфекционных вирусов ящура A№17 (Кыргызстан-2021). Однако произошло снижение титра инфекционности после обработки 0,0075% МЦ вируса O₁ (Тайвань) на 0,92 lg.

Таблица 3

Влияние полигексаметиленгуанидина на инфекционные свойства культурального вируса ящура

| Тип вируса | Титр инфекционности вируса (lgТЦД/мл) в суспензии, обработанной ПГ в концентрации (%) | | | |
|---------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| | До очистки | 0,001 | 0,005 | 0,0075 |
| A№17 (Кыргызстан-2021) | 7,13 | 7,25 | 7,5 | 7,25 |
| | 7,50 | 7,50 | 7,25 | 7,5 |
| | 7,23 | 7,0 | 7,18 | 7,13 |
| | 7,33 | 7,31 | 7,25 | 7,33 |
| M+m | 7,29±0,0729 p≤0,001 | 7,26±0,1031 p≤0,001 | 7,29±0,0620 p<0,001 | 7,30±0,0776 p≤0,001 |
| O ₁ (Тайвань) | 7,5 | 7,25 | 6,75 | 6,0 |
| | 7,25 | 7,0 | 6,5 | 6,0 |
| | 6,75 | 7,25 | 6,25 | 6,25 |
| M+m | 7,17±0,2205 p≤0,001 | 7,17±0,0833 p≤0,001 | 6,5±0,1443 p≤0,001 | 6,5±0,1443 p≤0,001 |

В наших опытах очистку вирусосодержащей суспензии МЦ проводили перед инактивацией. Однако, было замечено, что наибольший флокулирующий эффект балластных белков наблюдается, когда МЦ вносится в суспензию после окончания культивирования вируса, а затем добавляется АЭЭИ и 0,2% хлороформа.

Литература:

1. Беспалов И.М. Ящур и меры борьбы с ним. - Ф., 1980.
2. Сюрин В. Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьёв, Н.В. Фомина. - М., 2001.

3. Geering WA and Lubroth J (Food and Agriculture Organisation (FAO)), 2002. Preparation of Foot and Mouth Disease Contingency Plans. ISSN 1020-5187, Rome Available online: <http://www.fao.org/3/Y4382E/y4382e00.htm>
4. Leforban Y., 2003. Fie'vre aphteuse. In: Lefe'vre P-C, Blancou J and Chermette R (eds.). Principales maladies infectieuses et parasitaires du be'tail - Europe et re'gions chaudes. Co-e'dition TEC/DOC et Editions Me'dicales internationales Edition, Place Lavoisier, Lavoisier. - PP. 339-361.
5. Нургазиев Р.З., Кошметов Ж.К., Крутская Е.Д., Абдыкеримов К.А., Джапаралиев Н.Т., Ахмеджанов М. Дифференциальная диагностика заболеваний среди

мелких жвачных животных на территории Кыргызской
Республики. / Известия ВУЗов Кыргызстана. 2015. №. 7. С.

52-54.
