

ОСНОВНІ ПІДХОДИ ТА ВИМОГИ ДО ВИРОБНИЦТВА І КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ВАКЦИН ПРОТИ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТУ

*О. О. Напненко, канд. вет. наук, с. н. с.,
А. Ю. Ющенко, біолог першої категорії*

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

У статті наведені результати аналізу нормативних документів щодо виробництва та застосування вакцин проти нодулярного дерматиту великої рогатої худоби, зроблено акцент на рекомендаціях Міжнародного епізоотичного бюро. В умовах загрозової ситуації щодо поширення цієї хвороби на територію України питання вибору засобів специфічної профілактики є досить актуальними. Вірус нодулярного дерматиту має високу ступінь антигенної спорідненості з вірусами віспи овець та кіз, цю особливість у світі враховують при створенні та застосуванні гетерогенних вакцин. Проте Україна є вільною як від нодулярного дерматиту, так і від віспи овець, тому, на думку автора, більшим вірним є застосування гомологічних вакцин.

Ключові слова: НОДУЛЯРНИЙ ДЕРМАТИТ, ВЕЛИКА РОГАТА ХУДОБА, ВАКЦИНА, ЯКІСТЬ.

Нодулярний дерматит (Lumpy skin diseases, LSD) – хвороба великої рогатої худоби, збудником якої є капріпоксвірус першого серотипу, і яка характеризується лихоманкою, ураженням лімфатичної системи, утворенням вузликів на шкірі, слизових оболонках та внутрішніх органах тварин. Захворюваність коливається від 5 до 45 %, а смертність – до 10 %. Проте, відома закономірність, що хвороби, які на певній території спалахують вперше, поширюються з більшою інтенсивністю та перебігають набагато важче, ніж на стаціонарно неблагополучних територіях [1, 2].

Нодулярний дерматит входить до переліку хвороб, спалах яких обов'язково фіксується у Міжнародному епізоотичному бюро. До наших часів це захворювання ніколи не було зареєстровано на території України [1, 2].

До 1988 року хворобу реєстрували тільки у Африці, на південь від Сахари. За даними МЕБ, епізоотія нодулярного дерматиту ВРХ поширилася на території Росії, Болгарії, Угорщини, Австрії, Вірменії, Ірану, Казахстану, країн Балканського півострова: Болгарії, Греції, Македонії [1–3].

На думку провідних фахівців світу, зокрема експертів EFSA, вакцинація – найефективніший захід профілактики цієї хвороби [3].

Метою роботи було висвітлення основних вимог до виробництва та контролювання якості вакцин проти нодулярного дерматиту.

Для досягнення поставленої мети було проведено аналіз нормативних документів, які регламентують виробництво та оцінювання ефективності й безпечності вакцин проти LSD, зокрема рекомендації Міжнародного епізоотичного бюро.

Результати й обговорення.

Загальні відомості щодо виробництва вакцин проти LSD

Вірус нодулярного дерматиту ВРХ антигенно близькоспоріднений із вірусами віспи овець та кіз, що дало можливість створити та ефективно використати атенуйовані штами для створення гетерогенних вакцин.

Для виробництва вакцин проти LSD було використано чотири живі ослаблені штами *Capripoxvirus*: один Кенійський штам віспи овець і віспи кіз, які пасажували 18 разів в культурі LT, або ембріональних клітин м'язів; югославський штам RM 65 та румунський штами віспи овець, а також штам вірусу LSD із Південної Африки, який пасажували в культурі клітин нирки ягняти (60 пасажів) і в курячих ембріонах (20 пасажів). Всі відомі штами *Capripoxvirus*, виділені від ВРХ, овець та кіз, мають високий ступінь спорідненості, завдяки чому існує можливість перехресного захисту при використанні гетерогенних вакцин. Отже, можна забезпечити захист великої рогатої худоби від LSD з використанням штамів *Capripoxvirus*, які походять від овець або кіз. У 1989 і 1990 рр. в Єгипті для контролювання спалахів LSD було використано вакцину із румунського штаму віспи овець. Тим не менш, важливо проводити контрольні дослідження, і не робити щеплення худоби на піку лактації через значну чутливість окремих порід до введення вакцинного вірусу. Існує ймовірність пожиттєвого поствакцинального імунітету, хоча рівень антитіл з часом знижується. При щепленні спостерігається місцева реплікація капріпоксвірусу, що викликає системну реакцію. Існують дані, що обидва штами *Capripoxvirus* у разі регулярного використання в якості вакцини можуть викликати значну місцеву реакцію при введенні худобі окремих порід. Деякі власники вважають через це неприйнятним застосування гетерогенних вакцин, навіть при значних наслідках спалаху LSD [1-8].

На основі векторного переносу генів інших збудників, патогенних для жуйних тварин, розроблюється нове покоління рекомбінантних вакцин із використанням геному *Capripoxvirus*. Прикладом таких збудників може слугувати вірус чуми великої рогатої худоби і чуми дрібних жуйних тварин. Така вакцина буде забезпечувати комплексний захист від LSD і чуми ВРХ, проте комерційної доступної рекомбінованої вакцини проти LSD на даний час немає [1, 2].

Настанови щодо роботи з головною посівною культурою вакцинного вірусу (Master Seed)

а) характеристики культури вірусу

Штам *Capripoxvirus*, що використовують для виробництва вакцин, повинен мати відому історію походження: від яких тканин та від якого виду тварин був виділений. Штам повинен бути нешкідливим для усіх цільових порід великої рогатої худоби, у тому числі і для тільних тварин. Вірус не повинен передаватися від тварини до тварини, має залишатись ослабленим в ході пасажування на культурах тканин, забезпечувати повний захист від зараження вірулентним штамом збудника якнайменше 1 рік. Певна кількість посівної культури вірусу (Master Seed) повинна бути отримана і зберігатися для забезпечення відповідних робочих посівних культур (Work Sedd) регулярного виробництва вакцин.

Вакцинний штам не повинен мати реверсії патогенності через 4 пасажі на сприйнятливих тваринах.

б) метод культивування

Культура вакцинного вірусу повинна бути ліофілізована і зберігатися у флаконах по 2 мл за температури мінус (80–40) °С. Також можливе зберігання у нативному стані за температури мінус 20 °С, однак найбільша стабільність вірусу спостерігається при мінус 70 °С або нижче. Для отримання максимального врожаю, вірус культивують на первинній або вторинній культурі LT, яка отримана від овець. Також може бути використана культура клітин Vero.

в) перевірка якості вакцини

Посівні культури штаму вірусу повинні мати такі ознаки:

чистота: вільна від сторонніх вірусів, зокрема пестивірусів, таких як вірусна діарея ВРХ і прикордонна хвороба овець, та вільна від контамінації бактеріями, грибами та / або мікоплазмами;

безпе́чність: здатність викликати мінімальну клінічну реакцію у всіх порід великої рогатої худоби, за рекомендованого шляху введення;

ефективність: здатність стимулювати повний імунітет до LSD у всіх порід великої рогатої худоби, не менше ніж 1 рік після щеплення.

Вимоги до виробництва

Вакцини виготовляють на свіжих моношарах вторинної культури клітин LT. Флакон посівної культури вірусу розчиняють поживним середовищем і висівають на моношар LT, який був попередньо промитий свіжим фосфатно-буферним розчином. Для адсорбції вірусу моношар залишають на 15 хвилин при температурі 37°C перед тим, як внести повну необхідну кількість поживного середовища. Через 4-6 днів відмічають значний прояв (50-70%) цитопатогенної дії вірусу (ЦПД). Культуральну рідину піддають трикратному заморожуванню та розморожуванню, отриману суспензію видаляють і центрифугують за 600 g протягом 20 хвилин. До збору врожаю, культура повинна бути перевірена для виключення можливості неспецифічної ЦПД, помутніння або зміни рН середовища. Другий пасаж може знадобитися для отримання достатньої кількості вірусу для серійного виробництва (для отримання серії достатньо для 10⁶ доз, вихід з п'яти матрасів площею 175 см²).

Процедуру повторюють для усіх матрасів, вміст кожного з них окремо змішують з рівним об'ємом стерильного, охолодженого 5% гідролізату лактальбуміну і 10% сахарози, і переносять в індивідуальному порядку у пронумеровані пляшки для зберігання за температури мінус 20°C. Перед зберіганням, 0,2 мл видаляють з кожної пляшки для контролю стерильності.

Додатково збирають по 0,2 мл з кожного матрасу і об'єднують у загальну пробу (пул) об'ємом 2 мл для визначення титру вірусу.

Усі процедури підлягають обов'язковій валідації для усіх серій вакцини.

Контроль у процесі виробництва

В процесі виробництва контролюють культуру клітин та врожай вірусу.

Культуру клітин отримують з сім'яників здорового молодого баранчика вовняної породи з отар вільних від агенту скрепі овець. Під час культивування клітини мають бути без будь-яких ознак ЦПД, а також мати нормальну морфологію (переважно фібробластичну). Як правило, вони можуть бути успішно пасажовані до десяти разів. При використанні для виробництва вакцини, неінфіковані контрольні культури вирощують паралельно і підтримують протягом, принаймні, одного додаткового пасажу для подальшого спостереження. Культури клітин перевіряють на відсутність контамінації нецитопатогенними штамми вірусу діареї ВРХ та прикордонної хвороби овець за допомогою імунофлуоресценції або імунопероксидазним методами. Якщо це можливо, клітини повинні бути підготовлені і зібрані завчасно до виробництва вакцини, і запас зберігають в стерильному ДМСО (диметилловий сульфоксид) в рідкому азоті (1-2 мл аліквоти, що містять 20 × 10⁶ клітин / мл). Сироватка, яку використовують у ростовому середовищі має бути вільна від антитіл до *Capripoxvirus* і неконтамінована пестивірусами.

Сироватки крові та поживні середовища, які використовують у виробництві вакцини повинні бути перевірені на відсутність антитіл до *Capripoxvirus* та контамінації пестивірусами, іншими сторонніми вірусами, бактеріями, грибами та мікоплазмами.

Посівну культуру вірусу і готову вакцину титрують в культурі тканини у пробірках або мікроплашках. Мінімальна рекомендована комерційна доза вірусу у вакцинах у вакцинах кенійського та південно-африканського виробництва має бути 3,5 lg TCID₅₀, за мінімальної проективної дози 2,0 lg TCID₅₀. *Capripoxvirus* дуже чутливий до ультрафіолетового випромінювання, тому потрібно створювати захисні умови для запобігання зниження його активності в польових умовах. Рекомендована комерційна доза румунської вакцини проти віспи овець для великої рогатої худоби складає 2,5 lg SID₅₀ (інфекційних вівцедоз), а

рекомендована доза для худоби румунської вакцини проти віспи овець із RM65-адаптованого штаму становить $1g \ 3 \ TCID_{50}$.

Зразки вакцини повинні бути перевірені на відсутність контамінації сторонніми вірусами, включаючи цитопатогенні та нецитопатогенні штами пестивірусів. Для попередження специфічної ЦПД, перед контактом з культурою клітин зразки змішують з гіперімунною капріпокс-сироваткою, вільною від пестивірусів. Вакцину до завершення контролю стерильності та титрування зберігають за температури мінус 20 °C після чого передають на ліофілізацію. Після ліофілізації відбирають по п'ять випадково обраних ампул ліофілізованого препарату для підтвердження титру.

Серійний контроль

Кожну серію готової вакцини контролюють на виробництві.

Одним із обов'язкових показників якості вакцини є відсутність контамінації бактеріями та грибами. Контроль проводять методом висіву на поживні середовища за відповідних температурних режимів ($37 \pm 0,5$)°C та (23-25) °C.

Нешкідливість та ефективність контролюють на телятах молочних європейських порід, вільних від антитіл до *Capripoxvirus*. Сироватки крові відбирають у шести голів худоби, сприйнятливої до LSD. Попередньо для тварин створюють покращені умови утримання.

П'ять випадково обраних ампул ліофілізованої вакцини відновлюють стерильним ФБР і об'єднують.

Двом головам великої рогатої худоби вводять по 10 комерційних доз вакцини, залишок вакцини ще розбавляють стерильним ФБР і вводять двом тваринам підшкірно у рекомендованій дозі. Дві тварини є контрольними.

За тваринами встановлюють щоденний клінічний нагляд з вимірюванням ректальної температури. Усі результати записують.

На 21-й день після вакцинації від усіх шести тварин відбирають зразки крові та внутрішньошкірно заражають відомим вірулентним штамом *Capripoxvirus*.

За тваринами спостерігають впродовж 14 днів, усі результати занотовують. У контрольних тварин повинні проявитись типові клінічні ознаки LSD. У той час, не повинно бути жодних місцевих або системних реакцій у вакцинованих телят, окрім уповільненого типу алергічної реакції упродовж перших чотирьох днів. Зразки сироватки відбирають повторно на 30-й день після вакцинації. На наступний день 21 пробу сироватки досліджують на сероконверсію щодо обраних вірусних захворювань, з метою виявлення ознак можливої контамінації вакцини, а результати дослідження сироватки відібраної до введення вакцини та на 30-й день порівнюються, щоб підтвердити відсутність антитіл до інших вірусів. Дослідження вакцини за показником ефективності, можна не здійснювати кожної серії, якщо ці серії виготовленої із одної головної посівної культури, яка була контрольована за цим показником.

Через велику варіабельність відповіді у великої рогатої худоби на зараження LSD, у контрольних тварин може не бути генералізованого інфекційного процесу, однак повинна спостерігатись значна місцева реакція.

Повністю розчинену вакцину також тестують на мишах і морських свинках. Двом морським свинкам вводять внутрішньом'язово по 0,5 мл у задню ногу, і двом морським свинкам і шести мишам вводять вакцину інтраперитонеально по 0,5 мл і по 0,1 мл, відповідно. Двох морських свинок і чотирьох мишей тримають в якості контрольних. За тваринами спостерігають протягом 3-х тижнів, після чого виконують евтаназію та досліджують внутрішні органи. У жодної з тварин не має бути ніяких ознак патології через введення вакцини.

Активність вакцини контролюють обов'язково, особливо коли невідома мінімальна імунізуюча доза.

Це, як правило, здійснюють шляхом порівняння титру вірулентного вірусу введеного на боках вакцинованих і контрольних тварин. Після вакцинації, на бічних поверхнях щонайменше трьох тварин і трьох контрольних голять волосся. Готують в стерильному ФБР розведення вірусу (Log_{10}) і для зараження використовують шість розведень. Кожне розведення вводять внутрішньошкірно (0,1 мл кожного розведення) по довжині на боку у чотирьох повторностях. Кожне розведення засівають нижче вздовж боку. У контрольних тварин набрякла припухлість буде розвиватися, можливо, в ділянці усіх 24 місцях введення, хоча переважно буває незначна або відсутня реакція на чотирьох сайтах найбільшого розведення вірусу. У вакцинованих тварин слід розрізнити первинну реакцію гіперчутливості на ділянці щеплення протягом 24 годин, яка повинна швидко спадати. Невеликі ділянки некрозу можуть розвинути в місцях введення найбільш концентрованого вірусу. Титр контрольного вірусу обчислюють для вакцинованих і контрольних тварин; обраховують різницю; різниця в $2,5 \log\text{-титр} > \log_{10}$ приймається як доказ захисту.

Тривалість імунітету

Стійкість до вірулентного польового вірусу після вакцинації триває 2 роки у разі введення вакцинного кенійського штаму і до 3-х років – південноафриканського. Захист від генералізованої інфекції після внутрішньошкірної вакцинації є позитивним.

Тривалість імунітету після застосування вакцин, виготовлених з інших вакцинних штамів повинна бути встановлена для великої рогатої худоби шляхом проведення контрольованих випробувань, щоб уникнути хибного результату у разі появи польового вірусу.

Стабільність

Усі вакцини мають термін придатності 24 місяці. Однак, протягом терміну зберігання декілька серій вакцини регулярно перевіряють титруванням для підтвердження стабільності. Правильно виготовлені ліофілізовані вакцини проти LSD, особливо ті, що мають у складі захисне середовище (сахароза і гідролізат лактальбуміна), стабільні протягом більше 25 років за умов зберігання при температурі мінус 20°C і протягом 2-4 років при 4°C . Існують дані про те, що вакцини зберігають стабільність і за більш високих температур, проте контрольні експерименти щодо пролонгованого зберігання не були зареєстровані.

Виробництво ліофілізованої вакцини не потребує ніяких консервантів, окрім вищезазначеної сахароза та гідролізату лактальбуміну.

Запобіжні заходи (небезпеки)

Немає жодних запобіжних заходів – штами вірусу LSD не становлять небезпеку для здоров'я людини. Виключенням є контамінація сторонніми біологічними агентами.

ВИСНОВКИ

1. Відомо чотири основні штами *Capripoxvirus* із яких готують вакцини для боротьби з нодулярним дерматитом.
2. Імунітет у тварин щеплених проти нодулярного дерматиту напружений протягом часу не менше ніж 2 роки, але від генералізованої форми позитивний.
3. Вакцини проти нодулярного дерматиту, виготовлені із штамів вірусу віспи овець можуть викликати сильну побічну реакцію у лактуючих корів, тому за можливості краще застосовувати гомологічні вакцини.
4. Відповідно до рекомендацій Міжнародного епізоотичного бюро усі вакцини проти нодулярного дерматиту контролюють за показниками мікробіологічної чистоти, нешкідливості, активності та ефективності.

MAIN PRINCIPLE AND REQUIREMENTS FOR PRODUCTION AND QUALITY CONTROL OF VACCINES AGAINST LUMPY SKIN DISEASE

O. O. Napnenko, A. Ju. Jucshenko

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03151, Ukraine

S U M M A R Y

The article presents the results of an analysis of regulations on the production and use of vaccines against the Lumpy skin disease of cattle, emphasis on the recommendations of the OIE. In the context of a threatening situation for the spread of the disease in the territory of Ukraine the question of choice of specific means of prevention are highly relevant. The virus nodular dermatitis is a high degree of antigenic relationship with the smallpox virus of sheep and goats, this feature of the world into account when creating and implementing heterogeneous vaccines. However, Ukraine is free from both the Lumpy skin disease and from sheep pox, therefore, in my opinion, the best use of longer homologous vaccines.

The author describes in stages the general requirements for vaccine virus matrix culture, technology of its cultivation and storage.

Also described are the main approaches to the production and quality control of vaccines. Particular attention is paid to evaluating the safety and efficacy of.

Keywords: LUMPY SKIN DISEASE, CATTLE, VACCINE, QUALITY.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И ТРЕБОВАНИЯ К ПРОИЗВОДСТВУ И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ВАКЦИН ПРОТИВ НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА

A. A. Napnenko, A. Ju. Jucshenko

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов
микроорганизмов
ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты анализа нормативных документов по производству и применению вакцин против нодулярного дерматита крупного рогатого скота, сделан акцент на рекомендациях Международного эпизоотического бюро. В условиях угрожающей ситуации по распространению этой болезни на территорию Украины вопрос выбора средств специфической профилактики являются весьма актуальными. Вирус нодулярного дерматита имеет высокую степень антигенной родства с вирусами оспы овец и коз, эту особенность в мире учитывают при создании и применении гетерогенных вакцин. Однако Украина является свободной как от нодулярного дерматита так и от оспы овец, поэтому, по мнению автора, больше верным применение гомологичных вакцин.

Автором поэтапно описаны общие требования к матриксной культуре вакцинного вируса, технологиям его культивирования и хранения.

Также описаны основные подходы к производству и контролю качества вакцины. Особенное внимание уделено оцениванию безопасности и эффективности применения.

Ключевые слова: НОДУЛЯРНЫЙ ДЕРМАТИТ, КРУПНЫЙ РОГАТЫЙ СКОТ, ВАКЦИНА, КАЧЕСТВО.

Л I T E P A T Y P A

1. Lumpy Skin Diseases // OIE Terrestrial Manual.–2016 Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.13_LSD.pdf
2. OIE (2011) Lumpy Skin Disease. Terrestrial Animal Ethiopian Veterinary Association (EVA). Addis Health Code. OIE, Paris.
3. Urgent advice on lumpy skin disease// EFSA Journal View issue TOC Volume 14, Issue 8 August 2016 / - Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4573/full>
4. Lumpy Skin Disease / Abdulqa H. Y., Rahman H. S., Dyary H. O. et. al. // Reproductive Immunol Open Acc. - 2016. - 1:25. Available at: <http://reproductive-immunology.imedpub.com/lumpy-skin-disease.pdf>
5. Lumpy skin disease (LSD) in a large dairy herd in Israel / Brenner J, Haimovitz M, Oron E, et al. // Ref. Vet. – 2006. – 61: 73–77.
6. Appearance of skin lesions in cattle populations vaccinated against lumpy skin disease / Brenner J., Bellaiche M., Gross E. et al. // Vaccine. – 2009. – 27: 1500–1503.
7. Comparison of the efficacy of Neethling lumpy skin disease virus and x10RM65 sheep-pox live attenuated vaccines for the prevention of lumpy skin disease - The results of a randomized controlled field study / Ben-Gera J., Klement E., Khinich E. et. al. // Vaccine. – 2015. Sep 11;33(38):4837-42. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.071. Epub 2015 Aug 1.
8. Coetzer J. A. W., Tuppurainen E. Lumpy skin disease, in: Infectious diseases of livestock, edited by Coetzer JAW, Tustin RC. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa. – 2004. – 2: 1268–1276.
9. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three *capripoxvirus* vaccine strains against lumpy skin disease virus. / Gari G., Abie G., Gizaw D. et. al. // Vaccine. – 2015. – 33(28):3256-61. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.01.035.

Рецензент – В. Л. Коваленко, д. вет. н., ДНКІБ і ШМ.