

УДК 578.835:615.371/

330.131

© 2013

А.М. Головка,
*академік НААН**Державний*
науково-контрольний
інститут біотехнології
*і штамів мікроорганізмів**В.І. Сорока,**кандидат*
*ветеринарних наук**С.В. Дерев'янку,**Т.О. Бова,**кандидати*
*біологічних наук**Інститут сільсько-*
господарської мікробіології
та агропромислового
*виробництва НААН***ТЕШОВАК — НОВА ІНАКТИВОВАНА
ВАКЦИНА ПРОТИ ХВОРОБИ ТЕШЕНА
СВИНЕЙ**

*Розроблено інактивовану вакцину для специфічної профілактики хвороби Тешена свиней та проведено її комісійні випробування. Вакцину створено на основі штаму *Porcine teschovirus-1* «Дніпровський-34». Одноразове введення вакцини в дозі 2 см³ сприяє формуванню специфічного імунітету у свиней до збудника хвороби Тешена вже на 7-му добу і зберігається упродовж 11 міс. Максимальний рівень віруснейтралізуючих антитіл у крові щеплених тварин на 60-ту добу сягав 1:8192. Середньгеометричний титр антитіл становить 1:512, що забезпечує захист вакцинованих поросят навіть за інтрацеребрального введення 10 летальних доз контрольного епізоотичного 2високовірулентного штаму хвороби Тешена свиней «Чернігівський-2372».*

Ключові слова: вакцина, хвороба Тешена свиней, штам, імунітет, антитіла.

Ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней є однією з найнебезпечніших інфекційних хвороб і може завдавати свинарству значних економічних збитків. Збудником цієї хвороби є *Porcine teschovirus-1*. Ефективність боротьби з хворобою залежить від своєчасного проведення протиензоотичних заходів і, зокрема, якості вакцинних препаратів.

В Україні стрімко зростають обсяги застосування імунобіологічних ветеринарних препаратів [3], проте наявні вітчизняні та закордонні засоби специфічної профілактики хвороби Тешена [1, 4] не можуть задовольнити товаровиробників свинини з ряду причин: антигенна невідповідність виробничих штамів, виділених на початку 70-х років минулого століття, епізоотичним [2], висока реактогенність вакцин, недостатня напруженість поствакцинального імунітету, потреба багаторазового введення, висока в'язкість препаратів та ін. За результатами проведення епізоотологічного моніторингу нами встановлено низьку реактивність організму свиней на щеплення проти хвороби Тешена, що свідчить про недостатню імуногенність наявних вакцин і необхідність постійного контролю за напруженістю поствакцинального імунітету в господарствах, що потребує додаткових фінансових витрат.

Мета досліджень — створити сучасну вітчизняну інактивовану вакцину проти хвороби

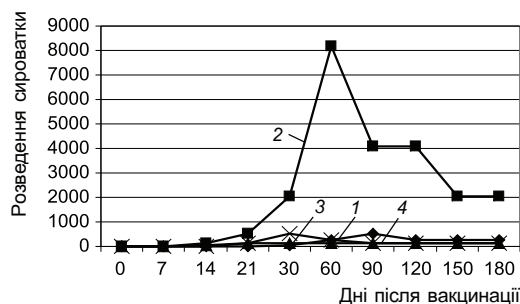
Тешена свиней та встановити її споживчі характеристики.

Методика досліджень. У дослідах використано епізоотичні, еталонні, референтні та виробничі штами вірусів виду *Porcine teschovirus-1*, «Дніпровський-34», «Городнянський-31», «Перечинський-642», «Чернігівський-2372», Talfan, Teschen 199 й Tirol з колекції Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН і гіперімунні кролячі сироватки крові до цих штамів, одержані за модифікованою нами схемою [7].

Досліди проводили в перещеплюваних лініях культур клітин нирки ембріону свині (СНЄВ), нирки новонародженого сірійського хом'яка (ВНК-21), тестикул поросят (ПТП) та нирки поросят (РК-15).

Титр вірусів визначали методом послідовних розведень у культурах клітин і вираховували за методом L.J. Reed і H. Muench [12].

Антигенну спорідненість штамів вірусів встановлювали в перехресній реакції нейтралізації вірусу в культурі клітин за 100 ТЦД₅₀ вірусного антигену та 10 нейтралізуючих доз гіперімунних сироваток крові [10]. Визначали титр антитіл у сироватці крові дослідних тварин також у реакції нейтралізації за 100 ТЦД₅₀ вірусу та послідовних 2-разових розведеннях сироваток крові згідно з розробленими рекомендаціями [11].



Динаміка формування імунної відповіді у поросят, вакцинованих експериментальними зразками інактивованої вакцини проти хвороби Тешена свиней: зразок 1 — штамп «Дніпровський-34» з ад'ювантом ISA 25; зразок 2 — штамп «Дніпровський-34» з ад'ювантом ВНДІЗТ; зразок 3 — штамп «Городнянський-31» з ад'ювантом ISA 25; зразок 4 — штамп «Городнянський-31» з ад'ювантом ВНДІЗТ

Інактивацію вірусу проводили етиленіміном згідно з розробленою нами технологією [5].

Було виготовлено 4 експериментальні зразки інактивованої вакцини проти хвороби Тешена свиней: зразок 1 — штамп «Дніпровський-34» з ад'ювантом ISA 25 (Франція), зразок 2 — штамп «Дніпровський-34» з ад'ювантом ВНДІЗТ (Російська Федерація) [9], зразок 3 — штамп «Городнянський-31» з ад'ювантом ISA 25, зразок 4 — штамп «Городнянський-31» з ад'ювантом ВНДІЗТ. Ад'юванти змішували з вірусомісною сировиною у співвідношенні 1:1, що дає змогу одержати емульсію, яку легко вводити тваринам навіть за низьких температур.

Вивчення антигенних властивостей експериментальних зразків вакцини проводили на поросят у віці 2 міс. Вакцину вводили поросяттам одноразово у дозі 2 см³.

Комісійні випробування відібраного перспективного зразка інактивованої вакцини проводили на поросяттах у віці 3,5 міс. у віварії Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН. За тваринами встановлювали клінічні спостереження з щоденним вимірюванням температури тіла.

Для визначення імуногенності та специфічності вакцини тваринам I групи внутрішньом'язово вводили по 1 дозі вакцини (2 см³). Тварин II групи не вакцинували. Через 30 діб тваринам I та II груп проводили інтрацеребральне зараження вірулентним епізоотичним штамом вірусу хвороби Тешена «Чернігівський-2372» у дозі 0,05 см³ (10 ЛД₅₀) з титром 4,5 Іg ТЦД₅₀/см³. Для визначення нешкідливості й ареактогенності поросяттам внутрішньом'язово вводили подвійну дозу вакцини (4 см³).

Термін придатності вакцини визначали в досліді на кролях. Тваринам I групи вводили внутрішньом'язово 1 дозу (2 см³) вакцини, яка зберігалась 12 міс. за температури 2–8°C, II групи — свіжовиготовлену вакцину та визначали динаміку утворення віруснейтралізуючих антитіл у сироватках крові.

Вивчення системи застосування вакцини проводили в ПАП «Снов» Чернігівського району Чернігівської області на новонароджених поросяттах від вакцинованих свиноматок і поросяттах різних вікових груп.

Результати досліджень. У результаті проведеного вірусологічного моніторингу на території України упродовж 2001–2010 рр. згідно з науково-технічними програмами НААН і визначенням антигенної спорідненості виділених епізоотичних штамів для виготовлення експериментальних серій вакцини відібрано штамми «Дніпровський-34» та «Городнянський-31». Установлено, що штамп «Дніпровський-34» антигенно споріднений з еталонними штамми *Porcine teschovirus-1* Talfan, Teschen 199 і Tirol, епізоотичним контрольним штамом «Чернігівський-2372» на 100% та вакцинним штамом «Перечинський-642» вірусу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней на 67%. Антигенна спорідненість штаму «Городнянський-31» з епізоотичними, виробничими та еталонними штамми становила 73–100%.

Максимальний рівень антитіл у крові щеплених тварин (1:8192) виявлено на введення зразка № 2, виготовленого на основі штаму «Дніпровський-34» і ад'юванту ВНДІЗТ (рисунк). Середньгеометричний титр віруснейтралізуючих антитіл за весь період дослідження становив 1:588. Поствакцинальні віруснейтралізуючі антитіла зберігалися в сироватках крові щеплених тварин у титрах 1:128–1:2048 упродовж 6 міс. Титр антитіл не знижувався менше захисного рівня і в наступні 5 міс. спостереження. На підставі одержаних результатів зразок № 2 був відібраний для проведення комісійних досліджень.

У результаті проведення комісійних випробувань встановлено, що вакцина нешкідлива й ареактогенна. Поросятта, яким вводили внутрішньом'язово подвійну дозу вакцини (4 см³), упродовж 14-денного спостереження були клінічно здоровими, запалення тканин на місці введення препарату не спостерігали, клінічних ускладнень і негативного впливу на приріст живої маси не виявлено (табл. 1).

Установлено антигенну та імуногенну активність виготовленого зразка інактивованої вакцини на поросяттах (табл. 2). У поросят за-

1. Нешкідливість та ареактогенність експериментального зразка інактивованої вакцини проти хвороби Тешена свиней на основі штаму «Дніпровський-34»

| Група тварин | № тварини | Жива маса, кг | | Приріст живої маси, кг | | Середньодобовий приріст, г | |
|-----------------|-----------|----------------|---------------|------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | | перед дослідом | після дослідю | кожної тварини | групи | кожної тварини | групи |
| I (дослідна) | 1 | 19,0 | 23,0 | 4,0 | 11,5 | 285,7 | 273,8 |
| | 2 | 17,5 | 22,0 | 4,5 | | 321,4 | |
| | 3 | 14,0 | 17,0 | 3,0 | | 214,3 | |
| II (контрольна) | 4 | 13,5 | 17,0 | 3,5 | 10,0 | 250,0 | 238,1 |
| | 5 | 16,5 | 21,0 | 4,5 | | 285,7 | |
| | 6 | 14,0 | 17,0 | 3,0 | | 214,3 | |
| | 7 | 12,0 | 14,0 | 2,0 | | 142,9 | |

хисний рівень віруснейтралізуючих антитіл (1:64 і вище) виявлено вже через 7 діб після вакцинації. Середньогометричний титр у цей час становив 1:104. Максимальний рівень антитіл спостерігали через 21–28 діб. Їхній середньогометричний титр становив 1:1024. Індивідуальні особливості організму поросят істотно не впливали на утворення у них імунної відповіді.

У результаті зараження встановлено, що щеплені поросята залишалися клінічно здоровими упродовж усього терміну спостереження (50 діб). Контрольні поросята на 11- і 23-ту добу захворіли з ознаками хвороби Тешена: відмова від корму, оглумоподібний стан, атаксія, тремор м'язів тулуба, ускладнене дихання, гіперстезія шкіри, клоніко-тонічні судоми, вищання, парез і параліч кінцівок. Поросля № 4 загинуло

через 14 діб, а № 7 вимушено забито через 26 діб після зараження. Під час розтину трупів виявлено патологічні зміни, характерні для хвороби Тешена.

За результатами дослідю з визначення системи застосування вакцини встановлено, що в сироватках крові поросят, народжених від вакцинованих свиноматок (визначення на 15-й день після народження поросят), середньогометричні титри віруснейтралізуючих колостральних антитіл становили 1:208 (табл. 3). З 15-го дня спостерігали поступове зниження рівня антитіл, через 60 діб він становив 1:14.

У поросят, щеплених вакциною проти хвороби Тешена до віку 2 міс., імунна відповідь була нижчою порівняно зі щепленими у віці 3,5–4 міс. У свиней, яким проводили щеплення у 3,5–4 міс., титри віруснейтралізуючих

2. Антигенна та імуногенна активність експериментального зразка інактивованої вакцини проти хвороби Тешена свиней на основі штаму «Дніпровський-34»

| Група тварин | № тварини | Титри антитіл* через/діб | | | | | Середньогометричний титр* | Результати зараження (захворіло/загинуло), діб | |
|-----------------|-----------|--------------------------|-----|-----|------|------|---------------------------|--|----|
| | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 | | | |
| I (дослідна) | 6 | 4 | 64 | 256 | 512 | 1024 | 256 | Клінічно здорові | |
| | 8 | 0 | 128 | 512 | 1024 | 1024 | 512 | | |
| | 9 | 2 | 128 | 256 | 2048 | 1024 | 512 | | |
| II (контрольна) | 4 | 2 | 0 | 4 | 2 | 4 | 2 | 11 | 14 |
| | 7 | 2 | 2 | 0 | 2 | 4 | 2 | 23 | 26 |

* Титри антитіл в обернених величинах (до табл. 2 і 3).

3. Антигенна активність експериментального зразка вакцини проти хвороби Тешена свиней у поросят різного віку

| Вік поросят | Середньогометричні титри антитіл* | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|-----|----|----|----|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | колостральні антитіла, через/діб | | | | | через/міс. | | | | | | |
| | 0 | 15 | 30 | 45 | 60 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 15–60 діб | – | 208 | 91 | 39 | 14 | – | – | – | – | – | – | – |
| 30–45 діб | – | – | – | – | – | 111 | 91 | 111 | – | – | – | – |
| 3,5–4 міс. | – | – | – | – | – | 512 | 676 | 588 | 588 | 676 | 446 | 512 |

антитіл через 7 міс. утримувались на захисному рівні і становили 1:512.

Установлено, що титри антитіл у сироватках крові кролів, яким вводили вакцину після терміну зберігання 12 міс., на 14-ту добу після введення були на рівні 1:128–1:256, свіжовиготовлену вакцину — 1:256–1:512. Титри віруснейтралізувальних антитіл у сироватках крові кролів через 28 днів після введення свіжовиготовленої вакцини і після її зберігання становили — відповідно 1:1024–1:2048 та 1:128–1:512. Отже, після зберігання 12 міс. за 2–8°C експеримен-

тальний зразок інактивованої вакцини проти хвороби Тешена виявився активним і придатним до застосування.

За результатами досліджень, штам «Дніпровський-34» депоновано в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів за № 486 та захищено патентом України на винахід [4], підготовлено нормативну документацію (Технічні умови України, Інструкція з виготовлення і контролювання якості, листівку-вкладку застосування) на вакцину.

Висновки

Створено нову вітчизняну інактивовану вакцину тешовак на основі високоімуногенного антигенно домінантного штаму «Дніпровський-34». Комісійні випробування інактивованої вакцини проти хвороби Тешена свиней підтверджують її надійні споживчі характеристики: високу специфічність, імуногенність, напруженість імунітету, антигенну активність, авірулентність, відсутність реакто-

генності, зручність у застосуванні навіть за низьких температур. Вакцина забезпечує високий рівень колостральних антитіл у новонароджених поросят, одержаних від вакцинованих свиноматок, тривалу напруженість імунітету. Має тривалий термін зберігання. Сукупність цих характеристик робить вакцину тешовак конкурентнішою щодо наявних вітчизняних і закордонних аналогів.

Бібліографія

1. А.с. 1040657 СССР А61 39/125. Вакцина проти хвороби Тешена свиней/В.Ф. Романенко, О.Г. Прус (СССР). — № 2838704/30–15; Заявл. 15.11.79.
2. Бузун А.І. Сучасні аспекти епізоотології хвороби Тешена//Вет. медицина. — 2002. — Т. 80. — С. 105–109.
3. Головка А.М. Стан та перспективи розвитку біопромисловості України/А.М. Головка, В.О. Ушкалов//С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. — Чернігів: ЦНІІ, 2011. — Вип. 14. — С. 137–146.
4. Дудников Л.А., Сергеев О.В., Апилер Т.И., Непоклонов Е.А., Сергеев В.А. Антигенная активность инактивированного препарата вируса болезни Тешена на свиньях в зависимости от адьюванта//Вирусные болезни с.-х. животных. — Владимир, 1995. — С. 152.
5. Пат. 31211 Україна МПК (2006) С12N 7/04. Спосіб інактивації вірусу ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней/Сорока В.І., Дерев'яно С.В., Бабіч Н.В., Бова Т.О.: Інститут с.-г. мікробіології УААН. — № u 200714613; заявл. 24.12.07; опубл. 25.03.08.
6. Пат. 57372 Україна, МПК⁸ С12N 7/00, А61К 39/125, А61К 39/187, С12R 1/92. Штам *Porcine teschovirus* для виробництва ветеринарних імунобіологічних препаратів/Дерев'яно С.В., Сорока В.І., Бокун А.О., Бова Т.О., Божок Л.В.; заявник і патентовласник Інститут с.-г. мікробіології НААН. — № u201009325; заявл. 26.07.2010; опубл. 25.02.2011. — Бюл. № 4. — 3 с.
7. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01). Спосіб одержання гіперімунної сироватки крові до вірусів тварин і рослин/Бова Т.О., Волкова І.В., Дерев'яно С.В. — № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011. — Бюл. № 8.
8. Пат. № 79396 Україна, МПК А61К 39/125 (2006.1), А61/39(2006.01), С12N 7/06(2006/01). Вакцина, інактивована проти хвороби Тешена свиней/Сорока В.І., Бова Т.О., Дерев'яно С.В.: Інститут с.-г. мікробіології та агропромислового виробництва НААН; заявка № u 2012 10599 від 10.09.2012 р.; опубл. 25.04.2013. — Бюл. № 8.
9. Пат. 2058154 Російська Федерація. МПК (1996) А61К39/135. Адьювант/Мамков Н.С., Дудников А.И., Михалишин В.В., Савельев В.Ю., Шипилов В.И., Ильина Г.П., Косульникова Н.А., Черкасова Г.А.; заявитель: Всероссийский науч.-исслед. ин-т защиты животных. — № r 92012922/13; заявл. 21.12.92; опубл. 20.04.96.
10. Прискока В.А., Собко А.И., Манзий К.В. Методические рекомендации по определению антигенного родства, различий и доминантности вирусных серологических реакциях. — К., 1987. — 19 с.
11. Рекомендації з діагностики, профілактики та ліквідації тешо- та ентеровірусних енцефаломієлітів свиней/[Укладачі: В.І. Сорока, А.О. Бокун, С.В. Дерев'яно та ін.]. — Чернігів: Інститут с.-г. мікробіології НААН, 2006. — 28. — С. 8.
12. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimation of fifty per cent endpoints// Am. J. Hyg. — 1938. — V. 27, № 3. — P. 493–497.

Надійшла 16.08.2013.