

УДК 636.09: 615.371:578.82/83

О. О. НАПНЕНКО, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ВАКЦИН ПРОТИ МІКСОМАТОЗУ КРОЛІВ ТА МЕТОДІВ КОНТРОЛЮВАННЯ ЇХ ЯКОСТІ

З метою посилення контролю за якістю вакцин проти міксоматозу кролів розроблено національний стандарт, що встановлює єдині технічні вимоги та методи контролю їх якості. Вимоги стандарту гармонізовані з вимогами Європейської Фармакопеї та рекомендаціями Міжнародного Епізоотичного Бюро.

Ключові слова: вакцина, міксоматоз кролів, методи контролю.

Міксоматоз кролів - висококонтагіозна вірусна хвороба кролів та зайців, яка характеризується появою на різних ділянках тіла тварини драглистих набряків, вузлів (міксом) і займає значну частку в інфекційній патології кролів. Збудником хвороби є вірус родини *Poxviridae* роду *Leporipoxvirus*, що містить дезоксирибонуклеїнову кислоту. Єдиним ефективним заходом щодо профілактики міксоматозу є вакцинація поголів'я, ефективність якої напряду залежить від якості вакцин [1, 2, 3].

В Україні зареєстровано сім вакцин проти міксоматозу кролів, з них три виготовляють два вітчизняні підприємства: Державне підприємство «Сумська біологічна фабрика» та НВП «Біо-Тест-Лабораторія». Нині технічні вимоги та методи контролювання цих вакцин встановлює ГОСТ 28086-89, який є застарілим і не враховує усіх вимог чинного законодавства. Відсутність єдиних вимог до технологічних процесів та умов виробництва вакцин, до методів та системи контролювання їх якості, недосконалість існуючих вимог викликає ряд непорозумінь під час виготовлення препаратів, контролювання їх якості та застосування.

Метою цієї роботи було розроблення та затвердження Державного стандарту України, що буде регламентувати вимоги та методи контролю якості вакцин проти міксоматозу кролів, гармонізованого з міжнародними вимогами. Дія стандарту буде поширюватись на сферу діяльності ветеринарної медицини та біологічної промисловості.

Матеріали і методи

З метою розроблення стандарту було проаналізовано усі чинні технічні умови на вакцини проти міксоматозу кролів, ГОСТ 28086-89 та їх вимоги порівняні з рекомендаціями Міжнародного епізоотичного бюро та вимогами Європейської Фармакопеї [4, 5, 6].

Згідно вимог цих документів за час розроблення стандарту було проведено контролювання якості понад 10 серій вакцин проти міксоматозу кролів,

виготовлених різними виробниками. В процесі апробації нового стандарту були використані нові чинні стандарти, що стосуються окремих груп препаратів, зокрема ДСТУ 4483:2005, ДСТУ 4517:2005, та ДСТУ 4613:2006 [7, 8, 9].

Усі серії вакцин були перевірені за біологічними показниками якості такими як нешкідливість, інфекційна активність вірусу у вакцині на кролях та в культурі клітин згідно технічних умов на відповідні вакцини.

Імуногенну активність контролювали на кролях вільних від антитіл до вірусу міксоматозу із застосуванням вірулентних штамів вірусу згідно технічних умов на відповідні вакцини.

Під час розроблення стандарту та апробації запропонованих до нього методів було враховано усі відмінності між вітчизняними вимогами та міжнародними. Проаналізовано суттєві недоліки та прорахунки у вітчизняній системі виробництва та контролю якості вакцин.

У результаті проведеної роботи було розроблено проект державного стандарту, який було розіслано на відгук науковим організаціям та виробникам вакцин проти міксоматозу кролів згідно з ДСТУ 1.2: 2001 та ДСТУ 1.5: 2003 [10, 11]. Зокрема першу редакцію стандарту було надіслано до технічного комітету стандартизації (ТК) 132 Засоби захисту тварин, корми та кормові добавки, функції секретаріату якого виконує Державний науково-контрольний і дослідний інститут ветпрепаратів, кормів і кормових добавок; Державного комітету ветеринарної медицини України, Мінагрополітики України, НДІ стандартизації ДП “УкрНДНЦ”, ННЦ “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини”, Інститут ветеринарної медицини УААН, Сумська державна біологічна фабрика, Херсонське державне підприємство - біологічна фабрика та НВП «Біо-Тест-Лабораторія».

Від усіх організацій було отримано відгуки із зауваженнями та пропозиціями, які були враховані під час розроблення остаточної редакції проекту стандарту.

Результати та обговорення. Результати проведеної роботи оформлені у вигляді остаточної редакції Національного стандарту «Препарати ветеринарні імунобіологічні. Вакцини живі проти класичної чуми свиней. Технічні вимоги та методи контролювання», який було погоджено з такими організаціями як ТК 132, ТК 149, Державний комітет ветеринарної медицини України, Мінагрополітики України, ДП “УкрНДНЦ”.

Погоджений проект стандарту передано до Мінекономрозвитку України з метою його прийняття та надання йому чинності.

Вимоги цього стандарту є обов’язковими для усіх підприємств, незалежно від їх відомчої підпорядкованості та форм власності, які виготовляють вакцини проти міксоматозу кролів; а також організацій, уповноважених на проведення їх державного контролю якості в Україні.

Живі вакцини проти міксоматозу кролів можна виготовляти із атенуйованих штамів вірусу міксоматозу кролів, що мають стабільні властивості і не здатні до реверсії і вони повинні відповідати вимогам розробленого стандарту, які наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Технічні вимоги до вакцин проти міксоматозу кролів

№ п/п	Показник якості	Вимоги до вакцин
1	Зовнішній вигляд	Таблетка білого з жовтуватим відтінком або блідорожевого кольору
2	Наявність сторонніх домішок, плісняви	Не допускається
3	Розчинність	До 2 хв без утворення пластівців і осаду
4	Масова частки води	(1-3) %
5	Наявність вакууму у флаконах	Повинен бути
6	Контамінація бактеріальною та грибною мікрофлорою	Відсутня
7	Контамінація мікоплазмами	Відсутня
8	Контамінація сторонніми вірусами	Відсутня
9	Нешкідливість	Нешкідливі
10	Інфекційна активність вірусу	Не менше ніж: 4,0 lg ID ₅₀ /см ³ – на кролях; 5,5 lg TCID ₅₀ /см ³ – в КК
11	Імуногенна активність	Захист від зараження не менше, ніж 80 % щеплених кролів

У цій статті ми хочемо звернути увагу на основні відмінності вимог розробленого від вимог технічних умов та ГОСТ 28086-89.

1. Відсутність чи наявність контамінації вакцин сторонніми вірусами перевіряють згідно з ДСТУ 4517:2005. Вакцини проти міксоматозу кролів перевіряють на відсутність чи наявність контамінації сторонніми вірусами в культурі клітин за можливим проявом ЦПД та феномену гемадсорбції, з додатковими дослідженнями щодо відсутності контамінації вірусом діареї ВРХ в реакції імунної флуоресценції в культурі клітин.

2. Контролювання відсутності чи наявності контамінації бактеріальною та грибною мікрофлорою здійснюють шляхом висівів на поживні середовища, якість яких підтверджена із застосуванням тест-штамів мікроорганізмів згідно з ДСТУ 4483.

3. Відсутність чи наявність контамінації мікоплазмами визначають шляхом висівів на поживні середовища, ростові властивості яких контролювані за допомогою тест-штамів мікоплазм згідно з ДСТУ 4613.

4. Нешкідливість вакцин контролюють за методикою описаною нижче.

Розчинену у співвідношенні 1:5 вакцину вводять п'яти кролям внутрішньом'язово в ділянці стегна. Об'єм дози становить $(5 \pm 0,1)$ см³. П'яти іншим кролям вакцину у розведенні 1: 1000 вводять внутрішньошкірно у 12 точок в ділянці спини та боків. У кожную точку ін'єкції вводять по $(0,25 \pm 0,01)$ см³.

За тваринами ведуть щоденне клінічне спостереження впродовж 28 діб.

За період спостереження у тварин не повинно бути відхилень від нормального клінічного стану: підвищення температури тіла вище ніж 39,5 °С; погіршення апетиту, патологічних змін у ділянці внутрішньо-м'язового введення вакцини. У місцях внутрішньошкірного введення вакцини, утворюються фіброми, які зникають до завершення періоду спостереження.

Вакцину вважають шкідливою, якщо щеплені кролі захворівають міксоматозом чи іншим захворюванням, у випадках їх загибелі. Ознаками шкідливого впливу вакцини є кон'юнктивіт, риніт, поява фіброми у різних ділянках тіла: повіках, вухах, в ділянках статевих органів тощо.

Результат вважають сумнівним, якщо тварини не мають характерних ознак захворювання після введення вакцини, але за наявності тривалого пригнічення, підвищення температури тіла до 40,0 °С і вище, а також у випадках, коли фіброми, що утворилися в місцях внутрішньошкірного введення вакцини не зникають впродовж 28 діб

5. Інфекційну активність вірусу у вакцині можна контролювати двома методами: в культурі клітин кроля або на кролях.

Метод контролювання інфекційної активності вірусу на кролях, передбачає використання кролів вільних від антитіл до вірусу міксоматозу.

Вакцину з трьох флаконів (ампул) розчиняють до вихідного об'єму 0,9 %-вим розчином натрію хлориду і об'єднують у єдину пробу, з якої готують десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-6} на тому ж розчині.

Місце введення вакцини оголюють від шерсті та обробляють етиловим спиртом з масовою часткою, що становить 70 %.

Інфекційну активність вірусу визначають шляхом титрування вакцини внутрішньошкірним введенням. Для дослідження використовують не менше ніж двох кролів. Розчинену вакцину вводять внутрішньошкірно, починаючи з розведення 10^{-6} і до 10^{-2} , в напрямку від хвоста до голови у чотири точки по лінії перпендикулярній хребту тварини. Виконують по дві ін'єкції з кожної сторони об'ємом по 0,25 см³ в кожную точку кожного розведення. Кожне наступне розведення вводять на відстані (3-4) см від попереднього. Таким чином, У шкіру спини і боків кожного кролика роблять 20 ін'єкцій. За кролями спостерігають впродовж десяти діб. Позитивною реакцією на введення вакцини є утворення фібром на (6-10) добу після введення.

Активність вірусу визначають за наявністю і розміром фібром, що утворилися на місцях введення вакцини. Візуальним оглядом враховують фіброми розміром (2-3) мм і більші. Під час вимірювання кутиметром шкіра на місці фіброми повинна бути товстіше від нормальної не менше ніж на 3 мм.

Розрахунок титру вірусу виконують за методом Ріда і Менча.

Отримані результати інтерпретують і виражають у вигляді кумулятивних даних. Інфекційна активність вірусу у вакцині повинна бути не нижче ніж $4,0 \text{ Ig ID}_{50}/\text{cm}^3$.

Метод контролювання інфекційної активності вірусу в культурі клітин, передбачає використання ліній клітин з тканин кролів: RCC, RK-13 або інші згідно з паспортом на КК.

Вакцину з трьох флаконів (ампул) розчиняють до вихідного об'єму поживним середовищем для культивування культур клітин і об'єднують у єдину пробу.

З єдиної проби готують десятикратні розведення від 10^{-1} до 10^{-6} на такому ж поживному середовищі яким розводили вакцину.

Для дослідження активності вірусу у вакцині відбирають 96-лунковий полістироловий планшет з вирощеною КК, що має суцільний сформований моношар клітин з характерною морфологією без ознак дегенерації. Для кожного окремого розведення вакцини використовують по чотири лунки відповідного ряду планшету.

В кожен ряд лунок з КК, після видалення ростового середовища, вносять по 180 мкл відповідного розведення вірусу, починаючи з 10^{-6} . Для контролю якості культури клітин залишають два ряди по 8 лунок з КК, замінивши ростове середовище на підтримуюче в такому ж об'ємі, тобто по 180 мкл у кожен лунку.

Плашку з інфікованою і контрольною КК інкубують за температури $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ впродовж 7-14 діб. Щоденно КК оглядають під мікроскопом на наявність ЦПД.

Інфекційну активність вірусу обраховують згідно з методом Ріда та Менча в модифікації Ашмаріна і виражають в тканинних цитопадичних дозах, які спричинили дегенерацію 50 % інфікованих клітин.

Вакцину вважають якісною якщо інфекційна активність вірусу в культурі клітин становить не менше $5,5 \text{ Ig TCID}_{50}/\text{cm}^3$.

6. Розроблений проект стандарту передбачає два методи контролювання імуногенної активності: з використанням вакцинного штаму вірусу та з використанням вірулентного штаму вірусу міксоматозу кролів.

Суть методу з використанням вакцинного штаму вірусу полягає в порівнянні інфекційної активності вірусу після щеплення неімунних кролів та попередньо імунізованих. Активність вакцинного вірусу міксоматозу кролів повинна бути не менше ніж на шести з восьми вакцинованих кролів не нижче, ніж на 3 Ig порівняно з активністю на контрольних неімунізованих тваринах.

Суть методу з використанням вірулентного штаму вірусу міксоматозу кролів полягає у тому, що вакциновані досліджуваною вакциною кролі після зараження повинні залишитися клінічно здоровими, а неімунізовані кролі після зараження повинні захворіти з проявом ознак характерних для міксоматозу кролів.

Висновки і перспективи подальших досліджень

1. Розроблено, погоджено та передано прийняття рішення щодо надання чинності національний стандарт «ДСТУ Препарати ветеринарні імунобіологічні. Вакцини проти міксоматозу кролів. Технічні вимоги та методи контролювання.

2. Введення в дію розроблюваного стандарту сприятиме поліпшенню якості вакцин та проведенню чіткого достовірного контролю показників якості. Дотримання вимог цього стандарту забезпечить ефективність та безпечність

застосування вакцин проти міксоматозу кролів і дозволить утримувати стабільність благополучної епізоотичної ситуації.

3. Після введення в дію розробленого стандарту ГОСТ 28086-89 втрачає чинність.

Список використаної літератури

1. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів / Л.Є. Корнієнко, О.Б. Домбровський, С.І. Пономар, А.А. Антіпов. – Біла Церква, 2003. – 288 с.
2. *Евтушенко А. Ф.* Болезни кроликов. – Киев : Урожай, 1992. - 160 с.
3. *Напненко О. О.* Міксоматоз кролів/ О. О. Напненко // Здоров'я тварин і ліки. – 2006. - № 5 (54). – с. 23
4. ГОСТ 28086-89 Вакцина против миксоматоза кроликов. Технические требования и методы контроля.
5. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), Publisher: Paris : OIE, World Organisation for Animal Health. - 2008.
6. European Pharmacopoeia in 6 vol./ Sixth Edition. Main 1. - Edition of the Council of Europe, Strasbourg, France. - 2007.
7. ДСТУ 4483:2005 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибної контамінації
8. ДСТУ 4517: 2006 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами
9. ДСТУ 4613: 2006 Препарати біологічні для ветеринарної медицини. Метод виявлення контамінації мікоплазмами
10. ДСТУ 1.2: 2001 Національна стандартизація. Порядок розроблення національних нормативних документів.
11. ДСТУ 1.5: 2003 Національна стандартизація правила побудови, викладання, оформлення та вимоги до змісту нормативних документів

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ВАКЦИН ПРОТИВ МИКСОМАТОЗА КРОЛИКОВ И МЕТОДОВ КОНТРОЛИРОВАНИЯ ИХ КАЧЕСТВА / Напненко А. А.

С целью усиления контроля за качеством вакцин против миксоматоза кроликов разработан национальный стандарт, который устанавливает единые технические требования и методы контроля их качества. Требования стандарта гармонизированы с требованиями Европейской Фармакопеи и рекомендациями Международного Эпизоотического Бюро.

Ключевые слова: вакцина, миксоматоз кроликов, методы контроля.

STANDARDIZATION OF LIVING VACCINES IS AGAINST MIXOMATOSIS RABBITS AND METHODS OF CONTROL OF THEIR QUALITY / Napnenko A. A.

With the purpose of strengthening of control after quality of vaccines is against mixomatosis rabbits a national standard which sets the unique technical requirements and methods of control of their quality is developed. The requirements of standard are harmonized with the requirements of European Pharmacopoeia and recommendations of Organisation International des Epizootic.

Key words: vaccine, mixomatosis rabbits, methods of control.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Н. В. Гаврасьєва.

Рукопис надійшов 17. 07. 2013р.