

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

RESEARCH ON EFFICACY OF ATTENUATED VACCINE AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER ACCORDING TO PHARMACOPEA 2005

*Dragica Stojanović¹, Radimir Ratajac, Jasna Prodanov-Radulović,
Maja Velhner and Radoslav Došen*

¹ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20, Novi Sad, Republic of Serbia

The protective effect of attenuated vaccine against classical swine fever virus (CSFV) was tested in a controlled experiment. The vaccine Lavir-K[®] contains the China (C) strain of CSF virus and in the Republic of Serbia it is used for systemic immunoprophylaxis. The challenge experiment was done according to the European Pharmacopea (5th Edition, 01/2005:0065) and according to recommendation provided by the Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (OIE, 2008). The experiment was carried out on 12 weaned pigs, 7 weeks of age, randomly assigned to three groups. In the group A there were five animals, vaccinated with Lavir-K vaccine diluted 1:40, while in the group B there were five animals that were vaccinated with Lavir-K vaccine diluted 1:160. The control group consisted of 2 pigs that were not vaccinated. Before vaccination or challenge the blood samples were taken from all animals to detect antibodies against CSFV by ELISA test and bovine virus diarrhoea applying virus neutralization test. Fourteen days post vaccination all animals were challenged with highly virulent Baker strain. The experiment lasted for 14 days and during that time the pigs were clinically observed. In the first group of animals there were no clinical symptoms during the trial. However, in the second group, in two pigs the symptoms characteristic for CSF were noted. According to Spearman-Kärber equation the protective dose 50 (PD₅₀) of Lavir-K[®] was calculated to be 184, proving that the vaccine fulfils the requirements for vaccine potency.

Introduction. The causative agent of Classical swine fever (CSF) is a single stranded RNA virus belonging to the genus *Pestivirus* family *Flaviviridae* (Moening et al., 2000). Classical swine fever is a highly contagious haemorrhagic disease of pigs that can run in acute, subacute, chronic or late onset course, but also may go unnoticed (van Oirschot, 2003). The control of CSF in the European Union (EU) has been based on a policy of non-vaccination and stamping-out since the year 1980 (Dewulf, 2002; van Oirschot, 2003). In spite of the eradication program implemented within the EU, the outbreaks of the disease continue to occur, leading to serious losses (Moening, 2000). In the countries where CSF is endemic, prevention and control is primarily based on vaccination, using attenuated vaccines (Edwards et al., 2000; Blome et al., 2010). According to Official Gazette No 24/2011, the Republic of Serbia carries out mandatory prophylactic vaccination with the attenuated vaccine. Two commercial vaccines with China (C) strain are available in the country and these vaccines are regularly tested for their efficacy. The long-term goal is to adopt a non-vaccination policy (Prodanov et al., 2007).

In the paper the results of investigating protective effect of one commercial attenuated vaccine (Lavir-K[®]) under experimental conditions are presented. The potency testing was performed according to the guidelines of the Pharmacopea, 5th Edition, 2005 (01/2005:0065) and the guidelines published by the OIE, 2008.

Material and methods. The experiment was carried out in 12 clinically healthy, conventionally weaned pigs, aged 7 weeks, divided in 3 groups (group A, B and C). The experimental animals originated from the sows that were not vaccinated with C-strain of CSF virus. The pigs were of mixed sex, originated from the same, CSF-free herd. At the arrival all experimental animals were examined for the absence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV-1 and BVDV-2) and CSF virus antibodies. After one week of accommodation the group A, five pigs, was vaccinated with the Lavir-K vaccine diluted 1:40. The group B of five pigs was vaccinated with Lavir-K vaccine diluted 1:160. The vaccination was administered via intra-muscular (i.m.) route, according to the guidelines of the manufacturer. Fourteen days post vaccination (dpv) blood was taken from all animals and pigs were experimentally infected. For challenge infection the CSF virus (strain Baker) was used. The pigs were challenged with a dose of 1 ml by i.m. route. The titer was 2×10⁵ median tissue-culture-infective doses (TCID₅₀/ml). The control group consisted of 2 unvaccinated pigs infected with Baker virus and served as a challenge control.

After the challenge, all the pigs were examined clinically in the next 14 days. The following symptoms were recorded during the clinical examination: liveliness, conjunctivitis, constipation-diarrhoea, ataxia, convulsions, posterior paresis, erythema and haemorrhages of the skin. Rectal temperature and mortality were recorded daily. Necropsy was performed on all animals immediately after death. Fourteen days post infection (dpi) surviving pigs were euthanized, with T61[®] (Intervet International). Tissue samples (tonsils, spleen, kidney and mandibular lymph nodes) were collected from every pig in order to examine the presence of CSF virus antigen.

For CSF antibody detection in serum, the commercial indirect immunoenzyme test (ELISA kit) (Herd Check CSFV Ab-ELISA test; IDEXX Scandinavia, Osterbybruk, Sweden) was used according to the manufacturer's instruction. For establishing presence of BVDV antibodies virus-neutralisation (VN) test was used. In order to detect antigen of CSF virus in tissues samples, the commercial direct E^{ms} ELISA test kit (Herd Check CSFV Ag ELISA Test Kit; IDEXX Laboratories, Scandinavia, Osterbybruk, Sweden) was used according to the manufacturer's instruction. The protective dose (PD₅₀) of Lavir-K[®] was calculated using the equation by Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

Розділ 5. Контролювання якості, випробування, стандартизація, сертифікація, маркетинг і провайдинг ветеринарних імунобіологічних препаратів

Results and discussion. Clinical symptoms were not detected during the trail in the group A (pigs vaccinated with vaccine diluted 1:40). After challenge, in the group B, 2 pigs became febrile on 3 dpi (Fig 1 and 2).

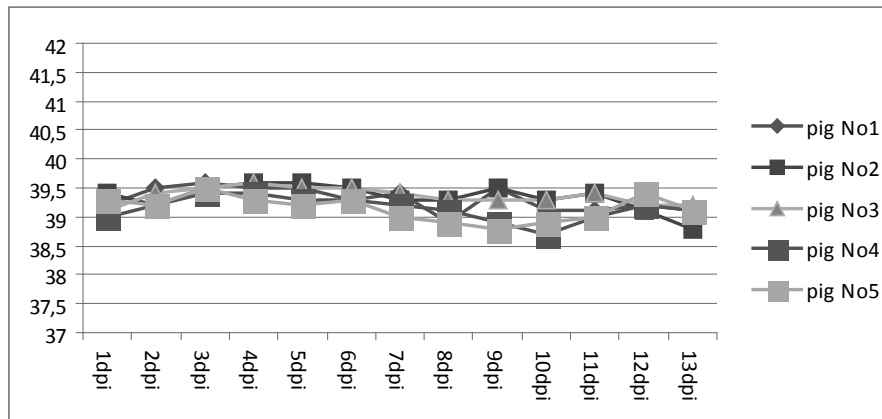


Fig. 1 Rectal temperatures (°C) of pigs infected 14 days after vaccination with Lavir-K diluted 1:40

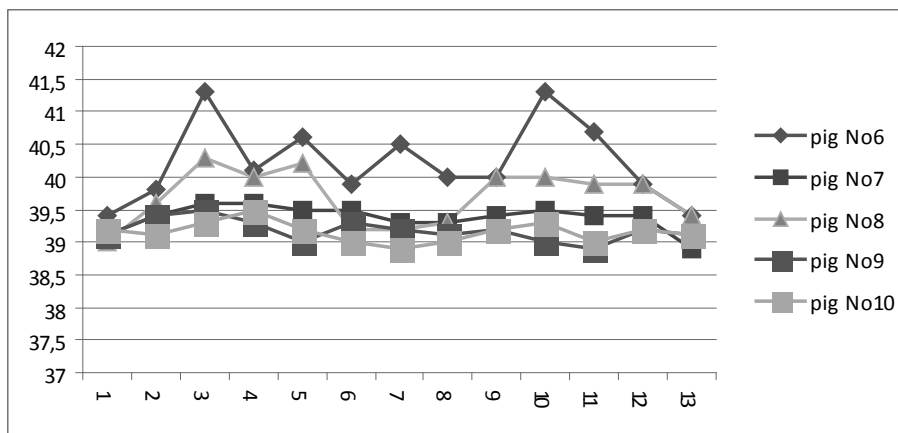


Fig. 2 Rectal temperatures (°C) of pigs infected 14 days after vaccination with Lavir-K diluted 1:160

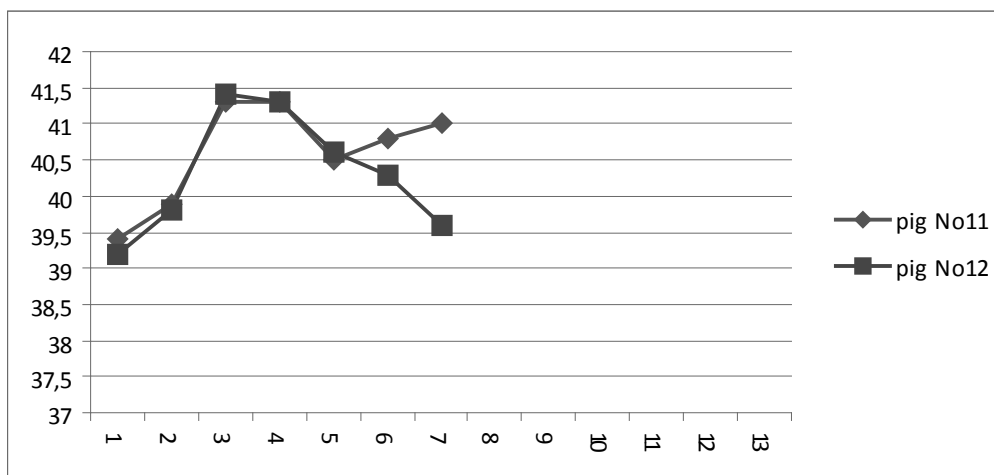


Fig. 3 Rectal temperatures (°C) of infected pigs in Control group

In both pigs skin lesions were recorded: cyanosis, erythema and petechial haemorrhages starting from 5 dpi. Further clinical symptoms of disease included apathy, dullness, conjunctivitis and constipation. Locomotive disturbance, ataxia, signs of posterior paresis and convulsions were noticed in one pig for the first time on 6 dpi. This animal died at 7 dpi. In the rest of the pigs in the group B, there were no clinical symptoms of the disease. Following CSF challenge, the animals from the control group exhibited distinct clinical signs of CSF infection starting from 2 and 3 dpi. The clinical symptoms included fever, lethargy, conjunctivitis, constipation and starting from 4 dpi, diarrhea. On the 5 dpi erythema and petechial haemorrhages were noticed. Clinical picture was dominated by locomotion disorders with the signs of ataxia and signs of posterior paresis (6 dpi). All the animals in this group died on 7 and 8 dpi.

The body temperatures and clinical signs were characteristic for the acute form of the disease (Dahle and Liess, 1992; Moennig et al., 2003; van Oirschot, 2003). Host factors appear to influence the outcome of infections with CSF virus strains of low to moderate virulence. However, in infections with highly virulent strain, host factors seem to be of minor importance (van Oirschot and Terpstra, 1989).

The presence of antibodies against CSF virus before challenge was detected in one pig from the group A. However at the end of the experiment (14 dpi) all the sera from vaccinated and experimentally infected pigs that survived were positive for CSF antibodies (ELISA test). It is assumed that neutralizing antibodies against CSF are detectable 2 weeks after infection at the earliest (Edwards et al., 2000). Vaccination with a C-strain vaccine induces neutralizing antibodies that are usually detectable about 2 weeks after vaccination and increase until at least 4-12 weeks. After a single vaccination antibodies can persist for many years but in some pigs they can disappear (van Oirschot and Terpstra, 1989).

Table 1. Antibodies and antigen in sera and organs of experimentally infected pigs

N° of pig	Pigs vaccinated with Lavir-K®				
	CSFV- antibodies 14 days post vaccination	Clinical symptoms	Death after challenge	14. day post challenge	
				CSFV- antibodies**	CSF antigen in the pulled samples of organs**
Dilution of vaccine 1 : 40					
1.	- At	-	*	+ At	- Ag
2.	- At	-	*	+ At	- Ag
3.	- At	-	*	+ At	- Ag
4.	+ At	-	*	+ At	- Ag
5.	± At	-	*	+ At	- Ag
Dilution of vaccine 1 : 160					
1.	± At	+	*	+ At	± Ag
2.	- At	-	*	+ At	- Ag
3.	± At	-	*	+ At	± Ag
4.	- At	-	*	+ At	± Ag
5.	- At	+	7 day	ND	+ Ag
Control (non-vaccinated pigs)					
1.	- At	+	7 day	ND***	+ Ag
2.	- At	+	7 day	ND	+ Ag

* sacrificed 14 days after challenge; ** At (positive +, negative -, suspicious ±) in the sera, Ag (positive +, negative -, suspicious ±) in the pulled samples of organs; *** Not done

All animals were submitted to a complete necropsy. In all succumbed piglets, pathomorphological examination has indicated the following lesions: haemorrhagic infarcts on the spleen, petechial haemorrhages in the kidneys, urinary bladder and lymph nodes, mucosal membranes and serous membranes. Hemorrhagic diathesis is considered to be important characteristics of CSF (Dahle and Liess, 1992; van Oirschot and Terpstra, 1989). In the control group pathomorphological lesions were typical for acute course of CSF, what is in accordance with the results of Prodanov et al. (2007). Surviving piglets were euthanized on 14 dpi (T61®, Intervet International). In the survived pigs (all pigs from the group A) and 3 pigs from the group B, the pathological signs of CSF were not detected.

The presence of CSF virus antigen was not found in tissue samples from the pigs in group A and in one challenged animal from B group. In all the pigs that died (one from group B and control group) the presence of viral antigen in the examined samples of the spleen, kidneys, mandibular lymphnodes and tonsils were detected. This result is in accordance with the data that highly virulent virus can be detected in most of the organs 5 - 6 dpi (van Oirschot and Terpstra, 1989)..

Calculation of the protective dose (PD₅₀) of Lavir-K® was 184, indicating that the attenuated vaccine Lavir-K® has a protective effect.

Conclusions. It may be concluded that attenuated vaccine Lavir-K® was efficient in protecting pigs against infection with highly virulent CSF strain, even when the vaccine was diluted 1:40 and 1:160. Two piglets vaccinated with the vaccine diluted 1:160 got sick but this did not influence the final PD₅₀ score (184 in the single dose of vaccine). Having in mind that one dose of vaccine should have protective value over 100, it can be concluded that the tested vaccine fulfills the requirements for vaccine potency as laid down in the European Pharmacopoeia and OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.

References

1. Blome S., Grotha I., Moennig V., Greiser-Wilke I.: Classical swine fever virus in South-Eastern Europe-Retrospective analysis of the disease situation and molecular epidemiology. *Vet Microbiol* 146, 276-284, 2010. 2. Dahle J, and Liess B: A review on classical swine fever infections in pigs: epizootiology, clinical disease and pathology. *Comp Immun Microbiol infect Dis* 15, 203-211, 1992. 3. Dewulf J.: A comparative study for emergency vaccination against classical swine fever with an E2 sub-unit marker vaccine and C-strain vaccine. In: *Epidemiology and control of classical swine fever: experimental assessment of virus transmission and potential benefits of emergency vaccination*. Ph.D. Thesis, Universiteit Gent, 159-179, 2002. 4. Edwards S., Fukusho A., Lefevre P.C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehe P., Westergaard J.: Classical swine fever: the global situation. *Vet Microbiol* 73, 103-119, 2000. 5. European Pharmacopoeia 6.0 ; Monograph : 01/2008:0065. 6. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV: Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ Sci Technol*, 117, 714-719, 1977. 7. Kleiboeker SB: Swine fever: Classical swine fever and African swine fever, *Vet Clin Food Anim* 18, 431-451, 2002. 8. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccine, OIE, fifth edition, 2008. 9. Moennig V.: Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet Microbiol* 7, 93-102, 2000. 10. Moennig V., Floegel - Niesmann and Greiser - Wilke I.: Clinical Signs and Epidemiology of Classical Swine Fever: A Review of New Knowledge. *The Veterinary Journal* 165, 11 – 20, 2003. 11. Prodanov Jasna, Došen R., Pušić I., Bugarski D., Valčić M.: Passive immunity evaluation in piglets originating from sows vaccinated with China strain of classical swine fever virus. *Acta Veterinaria*, 57, 413-427, 2007. 12. van Oirschot JT and Terpstra C: Hog Cholera Virus, In: Pensaert MB, editors, *Virus infections of porcines*, New York: Elsevier Science Publishers, 113-130, 1989. 13. van Oirschot J.T.: Vaccinology of swine fever: from lab to field. *Vet Microbiol* 96, 367-384, 2003

**ВИВЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АТЕНУЙОВАНОЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ КЛАСИЧНОЇ ЧУМИ СВИНЕЙ
ВІДПОВІДНО ДО ФАРМАКОПЕЇ 2005 РОКУ**

Драгіка Стоянович, Радомір Ратаяк, Ясна Проданов-Радуловіч, Майя Велнер, Радослав Дожен
Науковий Ветеринарний Інститут Нові Сад, Сербія

У статті представлено матеріали щодо вивчення ефективності атенуваної вакцини проти класичної чуми свиней відповідно до фармакопеї 2005 року. Проведено дослідження, в якому було доведено захисний ефект вакцини Лавір-К, що містить китайський штамп вірусу класичної чуми свиней і використовується в Сербії для системної імунопрофілактики.

УДК 636.09:619:579.887.111

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ МІКОПЛАЗМ

Андрущенко В.В., Ушкалов В.О.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

У природі мікроорганізми постійно перебувають у динамічному стані, а саме росту, розмноження і відмирання. Кожна клітина мікроорганізму має відповідні фази росту та певний період життя. У більшості випадків вегетативні форми мікроорганізмів мають досить невеликий життєздатний проміжок часу, насамперед поза межами природного середовища існування. Особливо цей момент важливий у сфері біотехнології та виробництві біологічних препаратів. У лабораторіях, де вивчають біологічні властивості і підтримують штами мікроорганізмів, виняткову увагу надають вивченню довготривалого зберігання культур у ліофілізованому стані. Адже, забезпечувати стабільні властивості більшості штамів мікроорганізмів впродовж значного проміжку часу, постійно їх пасажуючи на поживних середовищах, неможливо. Отже, основним технологічним прийомом для зберігання виробничих штамів є ліофілізація [1].

Щоб отримати повноцінну і стабільну в біологічному відношенні культуру мікроорганізму, необхідно забезпечити відповідні умови, а саме: якісне поживне середовище для накопичення біомаси; належні умови і тривалість культивування з урахуванням особливостей фаз росту кожного штаму; стабілізуюче захисне середовище; відпрацьований режим ліофілізації; температурний режим зберігання після сублимаційного висушування [2].

Представники класу *Mollicutes* є найменшими самореплікуючими прокаріотами, в яких відсутня ригідна клітинна стінка, яка характерна для бактерій. Вони мають лише цитоплазматичну мембрану товщиною біля 75 Å, яка складається із двох електронно-щільних і проміжного оптично світлого шарів, у склад яких входять полярні ліпіди (фосфоліпіди, гліцериди) та протеїни, що обумовлює специфіку морфологічних і фізіологічних властивостей таких як поліморфізм, пластичність, осмотична нестійкість до дії детергентів [3].

Враховуючи особливості морфологічних структур мікоплазм, завдяки своїй унікальній субклітинній будові, необхідно особливо ретельно ставитися до підбору оптимального стабілізуючого захисного середовища для ліофілізації представників класу *Mollicutes*.

Мета роботи. Провести підбір та вивчити вплив різних захисних середовищ на збереженість мікоплазм під час ліофілізації і впродовж тривалого зберігання.

Матеріали і методи. Для дослідження збереженості мікоплазм під час ліофілізації та впродовж тривалого зберігання нами було обрано чотири варіанти захисного середовища: інактивована сироватка крові коня (1:1) – № 1, інактивована сироватка крові коня (1:3) – № 2, середовище Файбіча – № 3 і середовище МГ (1:1) – № 4, виготовлені в секторі живильних середовищ та ліофілічної сушки ДНКІБШМ.

Моделлю для вивчення були обрані наступні тест-культури мікоплазм: *Mycoplasma arginini* G 230, *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 19610, *Mycoplasma hyorhinis* ATCC 17981 та *Acholeplasma laidlawii* ATCC 23206, отримані з колекції штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

Кожен штамп, з метою накопичення бактеріальної маси, вирощували на поживному середовищі для культивування мікоплазм та ахолоплазм, виготовленого в ДНКІБШМ згідно ТУ У 24.2 – 19024865-013: 2008 (РП № 3904-14-0402-08). Культивували культури у пробірках закритих гумовими корками, у термостаті за температури $37 \pm 0,5$ °C впродовж 24-72 год, враховуючи особливості фаз росту кожного із досліджуваних штамів, відповідно до їх паспортних характеристик.

Отриману бактеріальну суспензію кожного штаму поміщали в окремі скляні стерильні флакони і додавали потрібну кількість відповідного стабілізуючого захисного середовища. Ретельно змішували та фасували автоматичною піпеткою-дозатором по 1 см³ у пеніцилінові флакони. Тест-культури піддавали ліофілізації. Після ліофілізації визначали наявність вакууму в кожному флаконі. Флакони без вакууму бракували. Ліофілізовані культури зберігали в побутовому холодильнику за температури від 2 °C до 8 °C.

Одночасно, до змішування із захисним середовищем, в отриманому бактеріальному зборі кожного штаму визначали кількості живих мікробних клітин в 1 см³. Визначення кількості живих мікробних клітин мікоплазм в 1 см³ проводили методом граничних десятикратних розведень з наступним висівом бактеріальної суспензії по 0,1 см³ на щільне агаризоване середовища для культивування мікоплазм та ахолоплазм, використовуючи на кожне розведення по дві чашки Петрі. Засіяні чашки Петрі поміщали в термостат і культивували за температури $37 \pm 0,5$ °C впродовж 3-5 діб. Підрахунок колоній мікоплазм та ахолоплазми, що виростили на щільному середовищі, здійснювали за допомогою мікроскопу, проглядаючи кожну чашку при збільшенні $\times 40$. Кількості живих клітин в 1 см³ бактеріальної суспензії обраховували за загальноприйнятною методикою.

З метою визначення впливу захисного середовища на збереженість тест-культури мікоплазм під час ліофілізації та впродовж тривалого зберігання, висушених на різних захисних середовищах, здійснювали кількісний облік життєздатних клітин через 10-20 днів після ліофілізації, а також через 6, 12 та 18 місяців, методом граничних десятикратних розведень, описаного вище.

Результати досліджень. Результати досліджень, наведені в таблиці 1, свідчать, що на рівень збереженості тест-культури класу *Mollicutes* суттєво впливає склад захисного середовища.

Так, найвищий відсоток збереженості ми отримали під час ліофілізації штаму *M. arginini* G 230 з використанням стабілізуючого захисного середовища № 4 та № 3. Збереженість становить відповідно 97,41 % та 60,56 %. Захисне середовище № 1 і № 2 забезпечує збереженість лише на 10,4 % і 19,74 % відповідно.

Дещо гірші одержали результати збереженості під час ліофілізації штаму *M. hyorhinis* ATCC 17981 з використанням захисного середовища № 4, № 3 та № 2, відсоток живих мікробних клітин яких склав 30,33 %, 29,65 % та 15,96 % відповідно. Надзвичайно низький відсоток збереженості отримано при використанні середовища № 1 – 1,3 %.