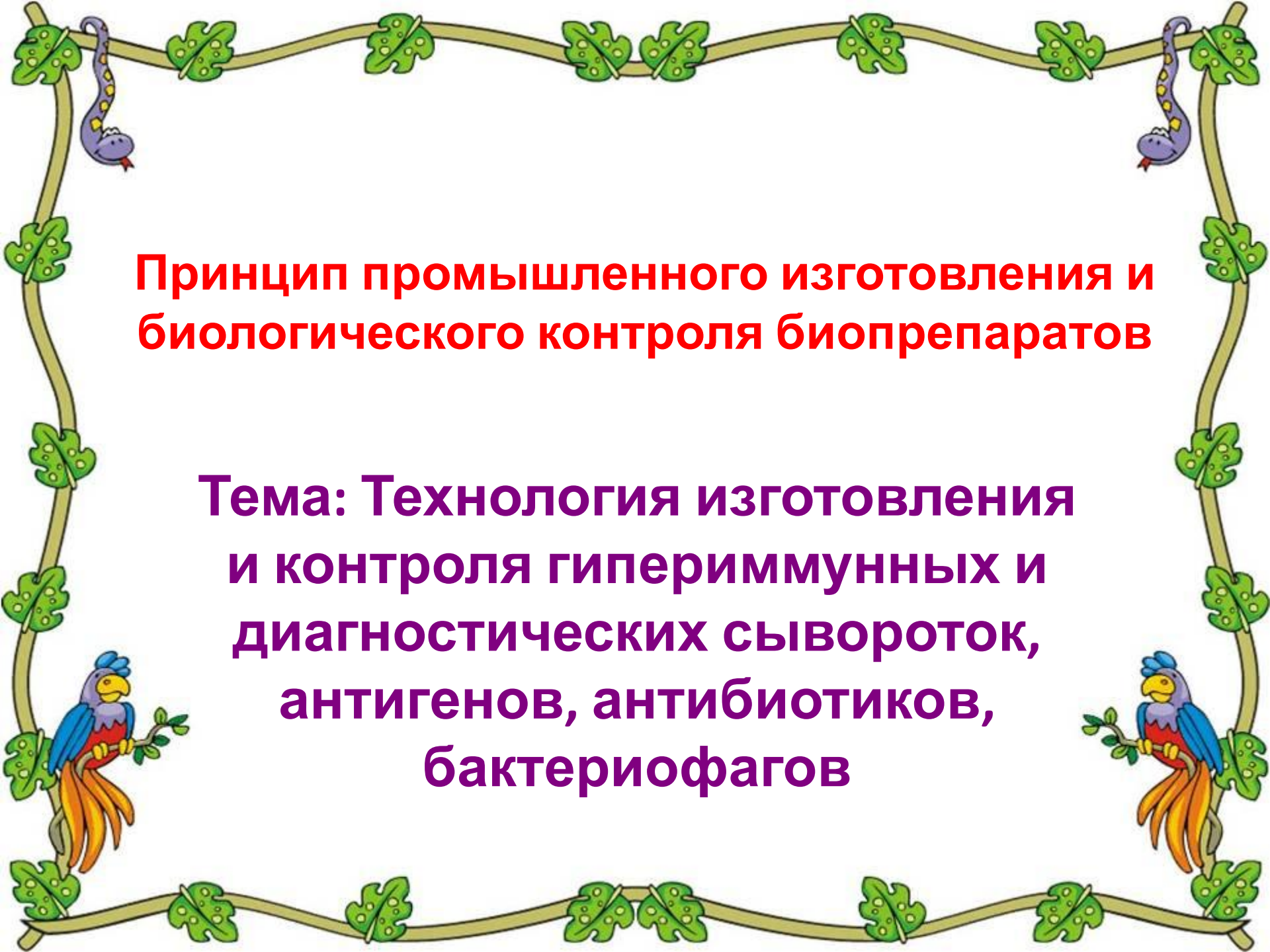
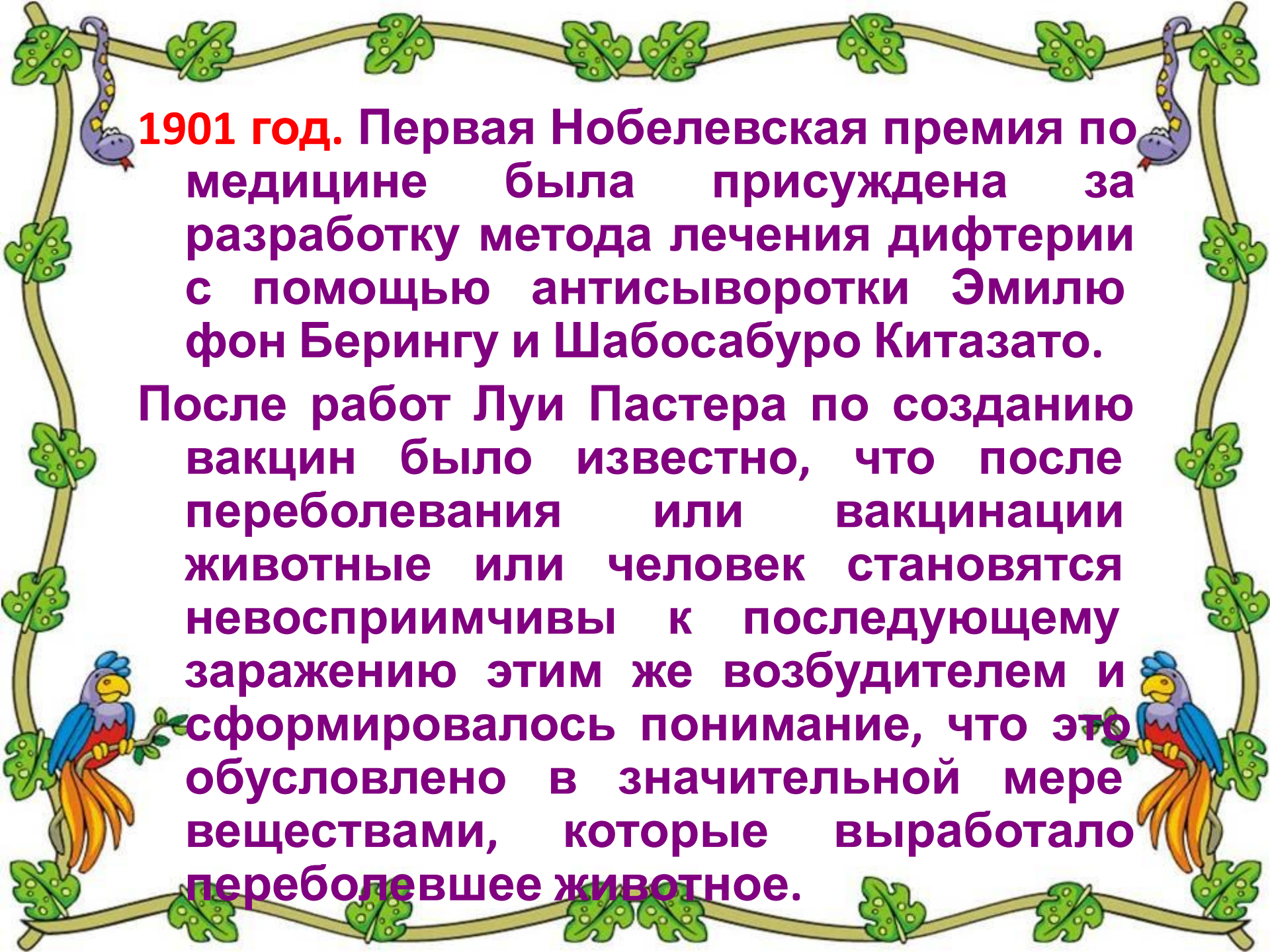




Принцип промышленного изготовления и биологического контроля биопрепаратов

Тема: Технология изготовления и контроля гипериммунных и диагностических сывороток, антигенов, антибиотиков, бактериофагов



1901 год. Первая Нобелевская премия по медицине была присуждена за разработку метода лечения дифтерии с помощью антисыворотки Эмилю фон Берингу и Шабосабуро Китазато.

После работ Луи Пастера по созданию вакцин было известно, что после переболевания или вакцинации животные или человек становятся невосприимчивы к последующему заражению этим же возбудителем и сформировалось понимание, что это обусловлено в значительной мере веществами, которые выработало переболевшее животное.



С 1901 года начали разработку
промышленного производства
антитоксических
противодифтерийных сывороток.

Первоначально использовали
сыворотку реконвалесцентов или
лошадиную антисыворотку, лошадей
при этом иммунизировали нативной
дифтерийной культурой.

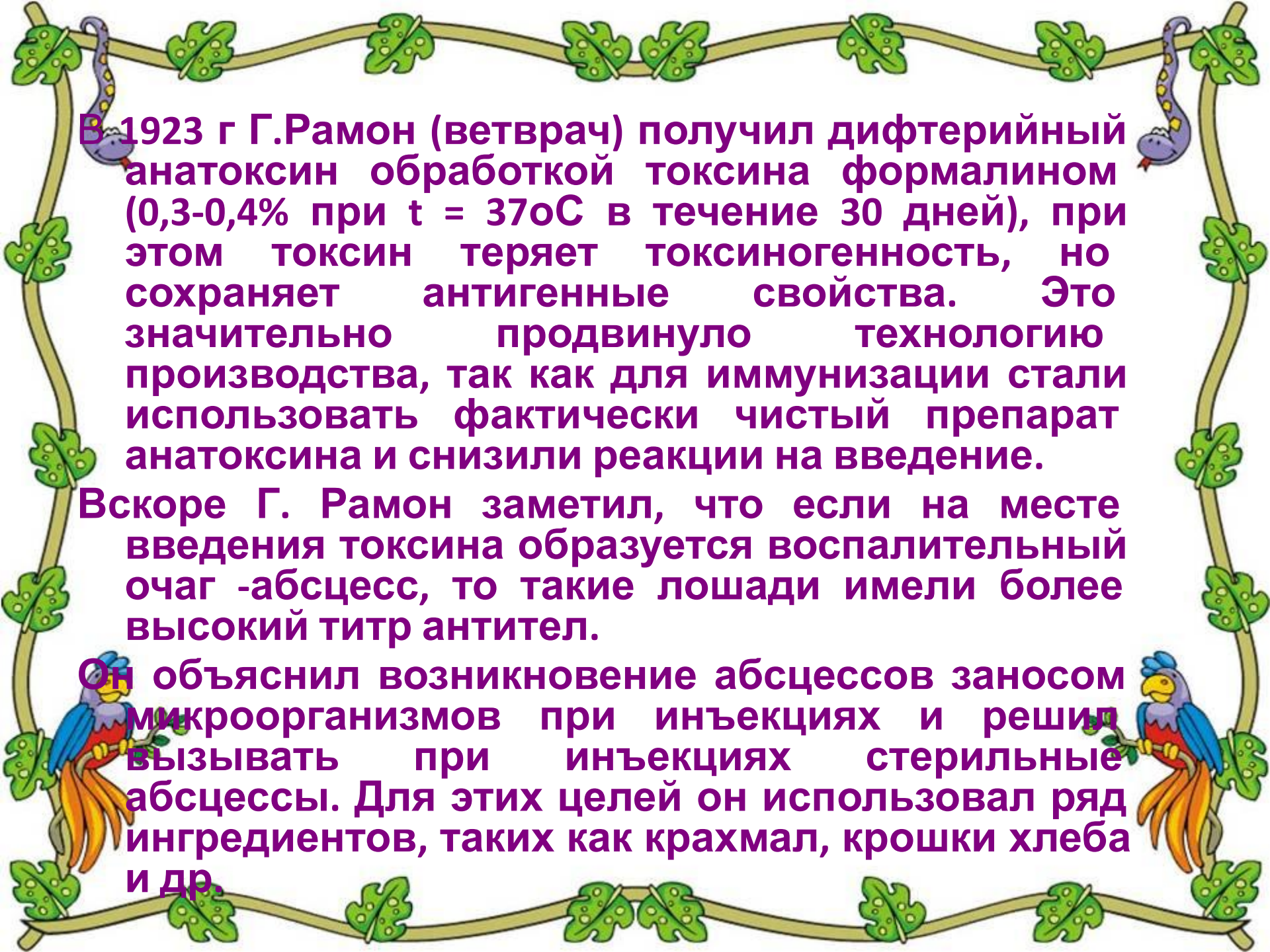
Однако полученные лошадиные
антисыворотки обладали
значительной анафилактогенностью,
что снижало эффективность этих
антисывороток.



Промышленное производство и применение антисывороток привело к открытию сывороточной болезни.

Неоднократное парентеральное введение антисывороток другого вида приводило к анафилактическому шоку.

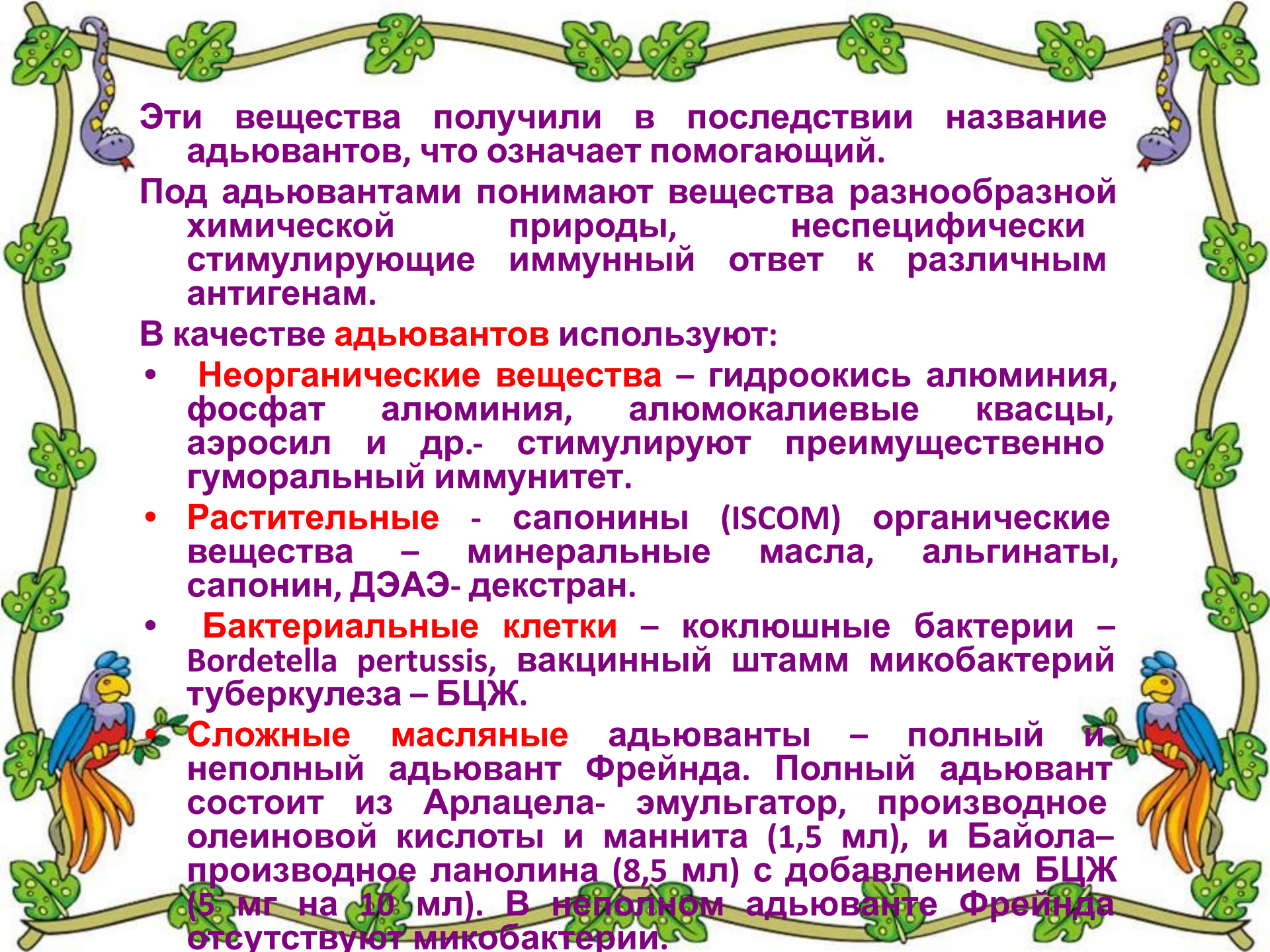
Впервые сывороточную болезнь наблюдал Смит в 1905 году, когда он внутрибрюшинно повторно вводил морским свинкам лошадиную сыворотку, то у них, спустя несколько минут или часов, появлялось беспокойство, одышка, гипотермия и животное погибало от анафилактического шока.



В 1923 г Г.Рамон (ветврач) получил дифтерийный анатоксин обработкой токсина формалином (0,3-0,4% при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 дней), при этом токсин теряет токсиногенность, но сохраняет антигенные свойства. Это значительно продвинуло технологию производства, так как для иммунизации стали использовать фактически чистый препарат анатоксина и снизили реакции на введение.

Вскоре Г. Рамон заметил, что если на месте введения токсина образуется воспалительный очаг -абсцесс, то такие лошади имели более высокий титр антител.

Он объяснил возникновение абсцессов заносом микроорганизмов при инъекциях и решил вызывать при инъекциях стерильные абсцессы. Для этих целей он использовал ряд ингредиентов, таких как крахмал, крошки хлеба и др.

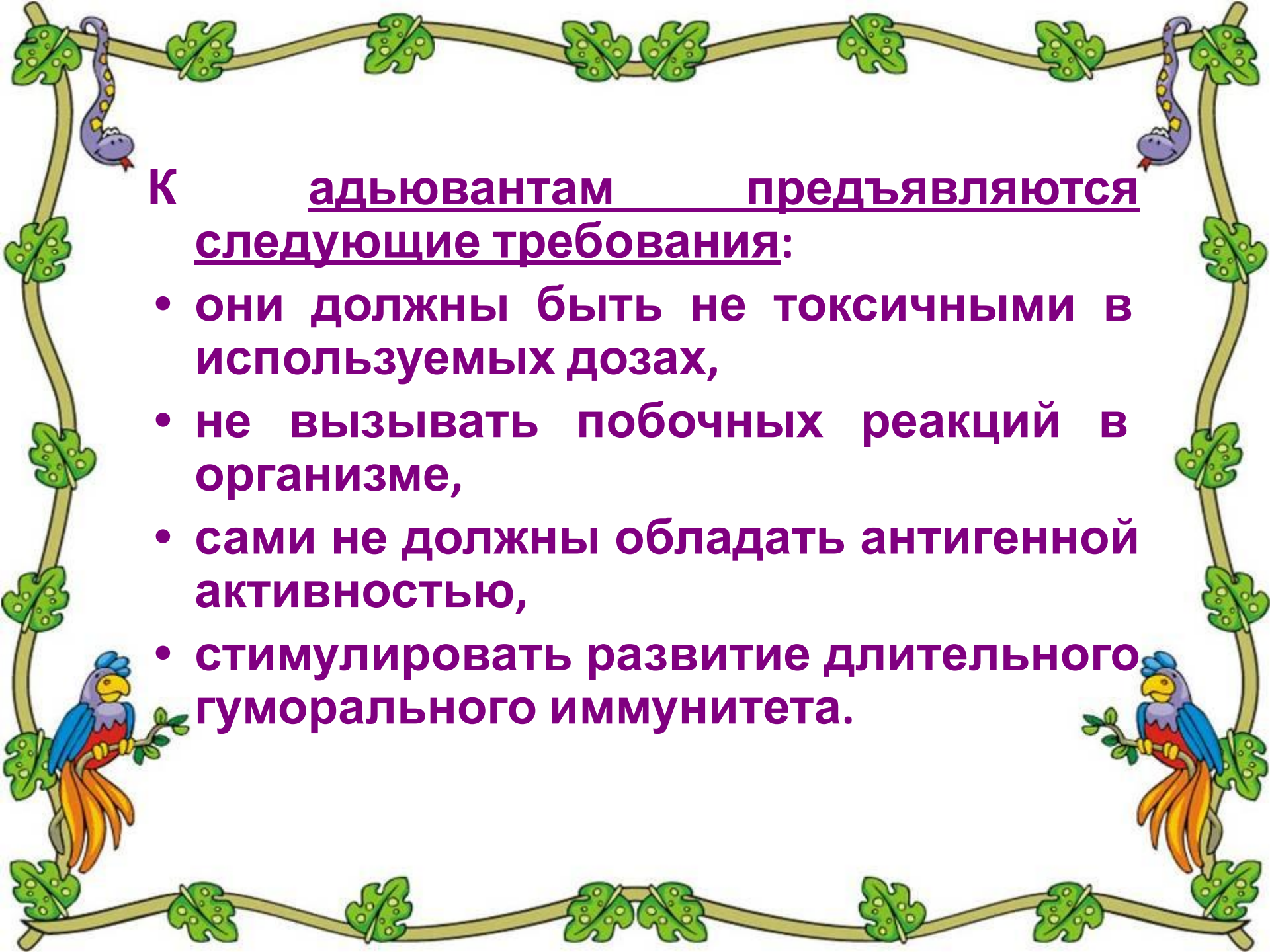


Эти вещества получили в последствии название адьювантов, что означает помогающий.

Под адьювантами понимают вещества разнообразной химической природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ к различным антигенам.

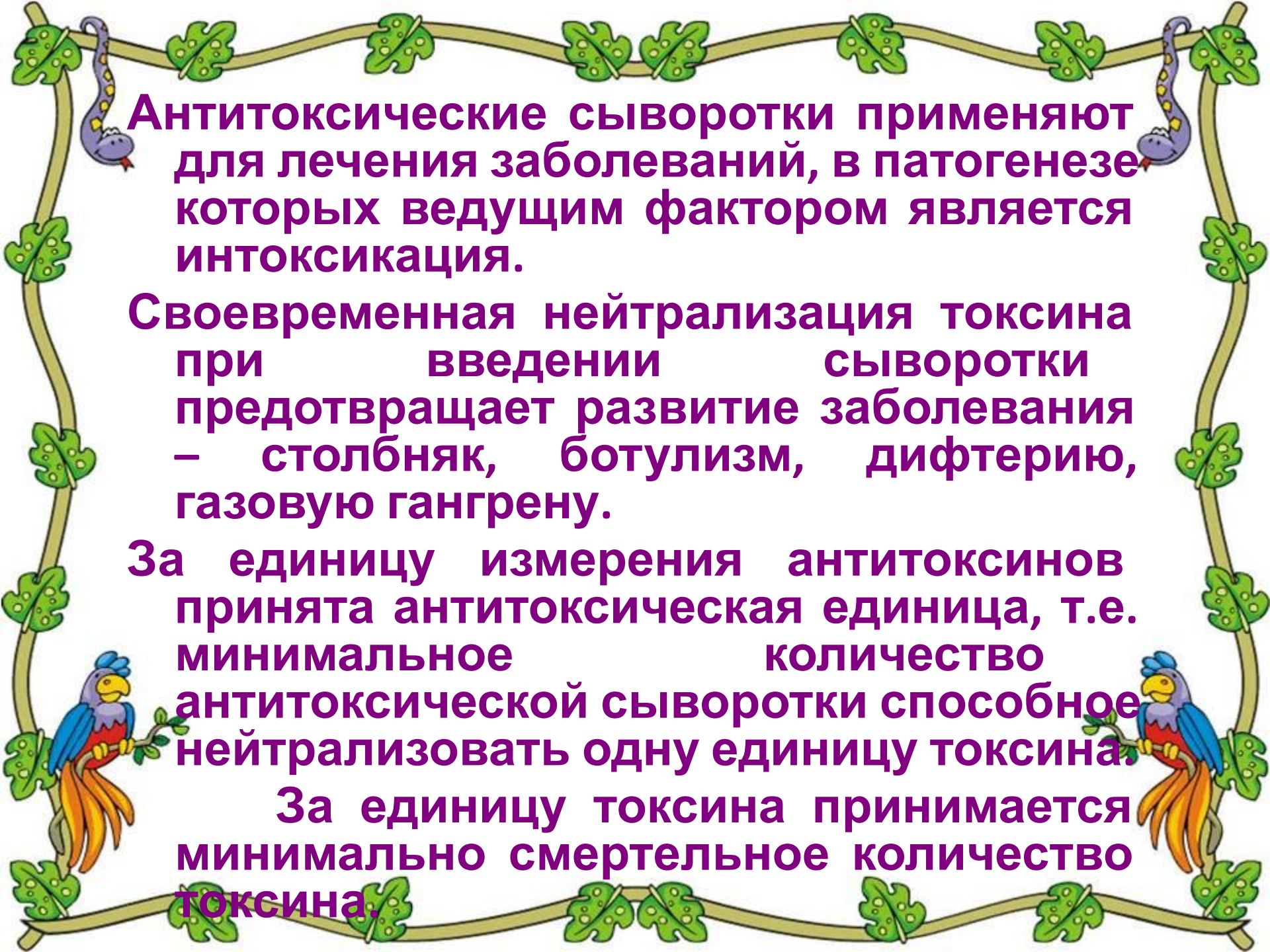
В качестве **адьювантов** используют:

- **Неорганические вещества** – гидроокись алюминия, фосфат алюминия, алюмокалиевые квасцы, аэросил и др.- стимулируют преимущественно гуморальный иммунитет.
- **Растительные** - сапонины (ISCOM) органические вещества – минеральные масла, альгинаты, сапонин, ДЭАЭ- декстран.
- **Бактериальные клетки** – коклюшные бактерии – Bordetella pertussis, вакцинный штамм микобактерий туберкулеза – БЦЖ.
- **Сложные масляные адьюванты** – полный и неполный адьювант Фрейнда. Полный адьювант состоит из Арлацела- эмульгатор, производное олеиновой кислоты и маннита (1,5 мл), и Байола- производное ланолина (8,5 мл) с добавлением БЦЖ (5 мг на 10 мл). В неполном адьюванте Фрейнда отсутствуют микобактерии.



К адьювантам предъявляются
следующие требования:

- они должны быть не токсичными в используемых дозах,
- не вызывать побочных реакций в организме,
- сами не должны обладать антигенной активностью,
- стимулировать развитие длительного гуморального иммунитета.



Антитоксические сыворотки применяют для лечения заболеваний, в патогенезе которых ведущим фактором является интоксикация.

Своевременная нейтрализация токсина при введении сыворотки предотвращает развитие заболевания – столбняк, ботулизм, дифтерию, газовую гангрену.

За единицу измерения антитоксинов принята антитоксическая единица, т.е. минимальное количество антитоксической сыворотки способное нейтрализовать одну единицу токсина.

За единицу токсина принимается минимально смертельное количество токсина.

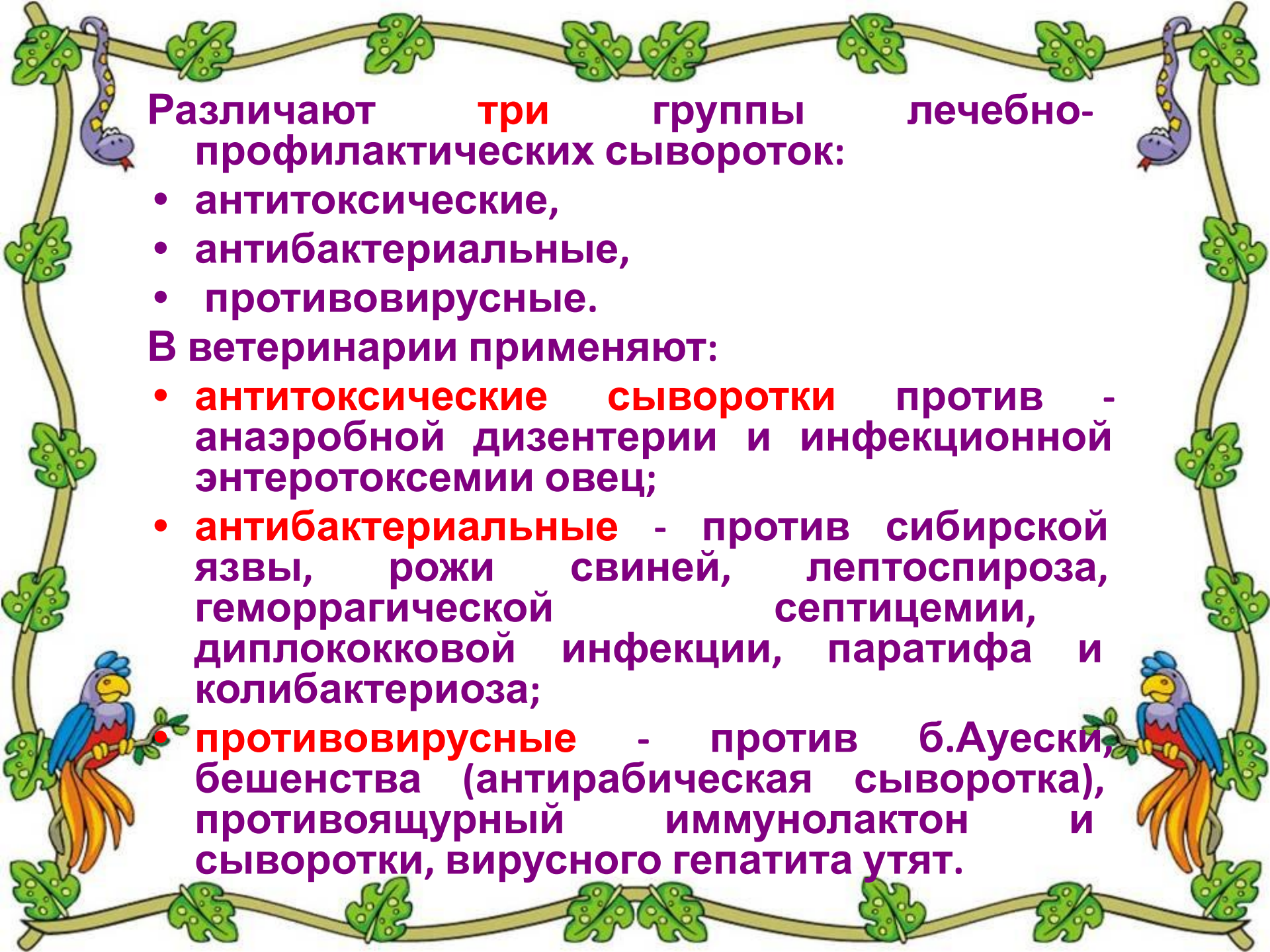


Производство лечебно-профилактических сывороточных препаратов представляет сложный и многогранный процесс с длительной технологией.

Различают два источника получения специфических сывороток:

1. Гипериммунизация животных других видов (гетерологичные сыворотки).

2. Вакцинация доноров (гомологичные сыворотки).



Различают **три** группы лечебно-профилактических сывороток:

- антитоксические,
- антибактериальные,
- противовирусные.

В ветеринарии применяют:

- **антитоксические сыворотки** против - анаэробной дизентерии и инфекционной энтеротоксемии овец;
- **антибактериальные** - против сибирской язвы, рожи свиней, лептоспироза, геморрагической септицемии, диплококковой инфекции, паратифа и колибактериоза;
- **противовирусные** - против б. Ауески, бешенства (антирабическая сыворотка), противоящурный иммунолактон и сыворотки, вирусного гепатита утят.

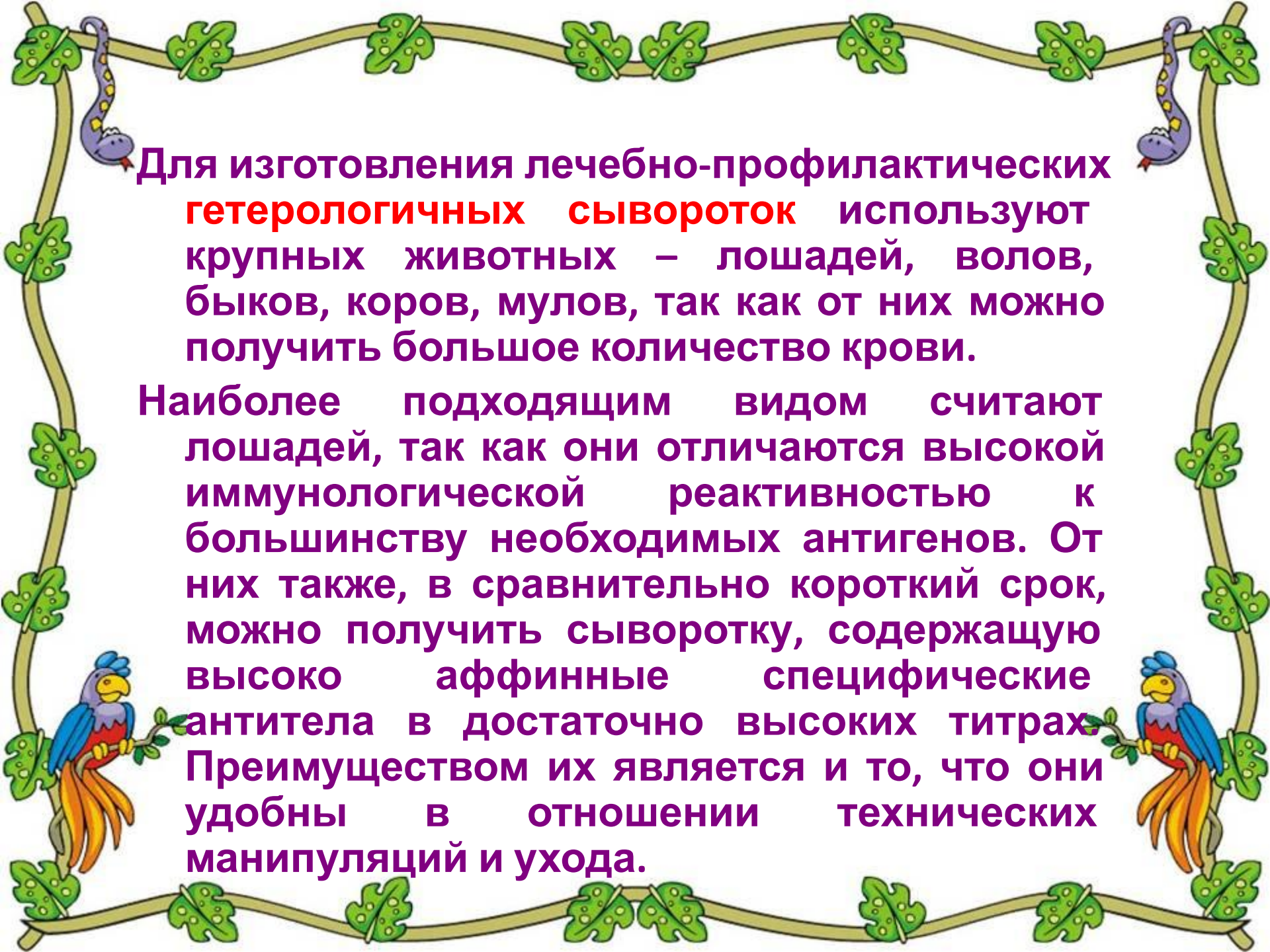


По **направлению** применения сыворотки гипериммунные различают:

- лечебные,
- профилактические
- диагностические.

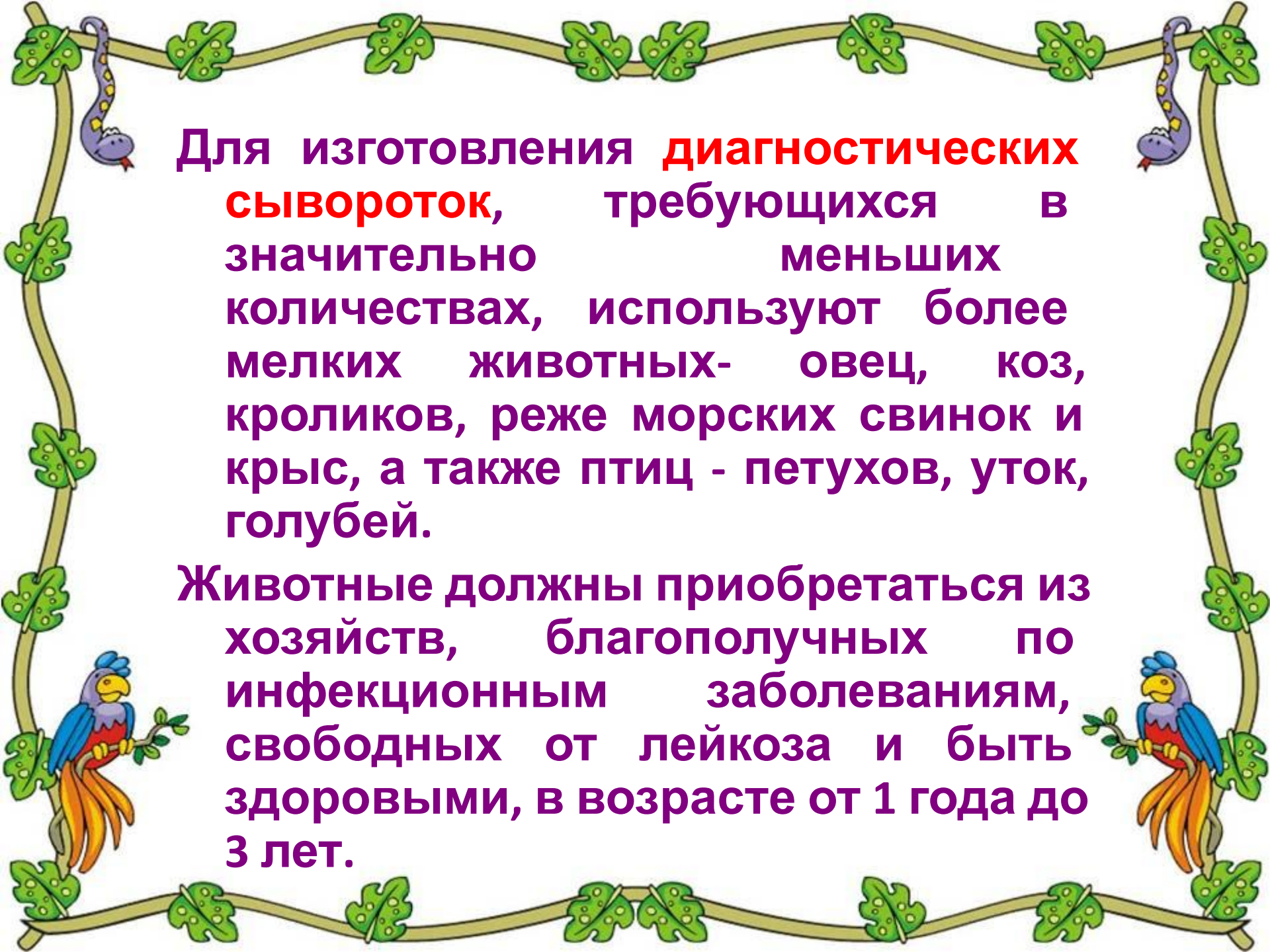
Диагностические сыворотки по **использованию** в различных реакциях подразделяют на:

нейтрализующие, преципитирующие, агглютинирующие, лизирующие, связывающие комплемент (для постановки РСК).

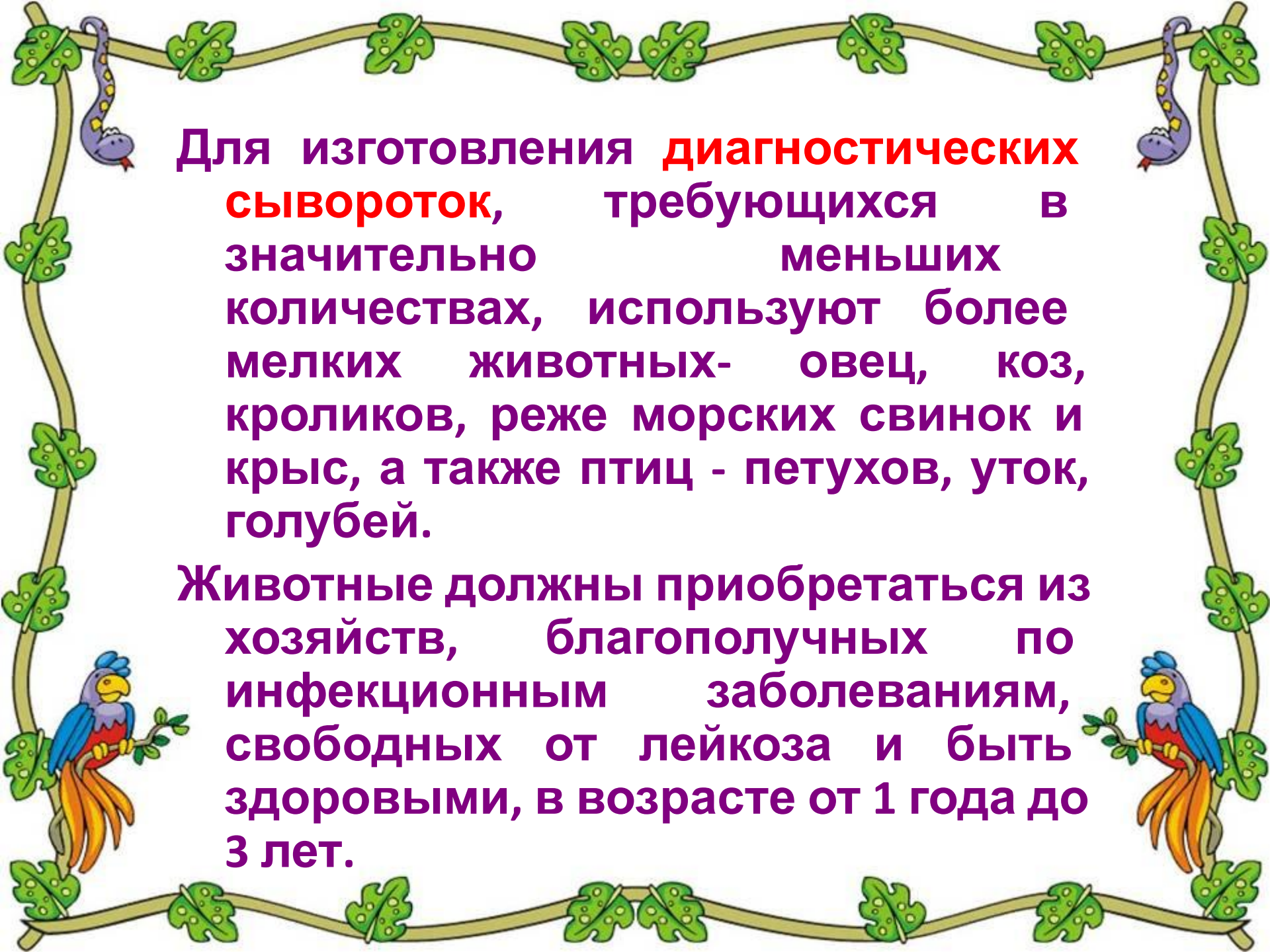


Для изготовления лечебно-профилактических **гетерологичных сывороток** используют крупных животных – лошадей, волов, быков, коров, мулов, так как от них можно получить большое количество крови.

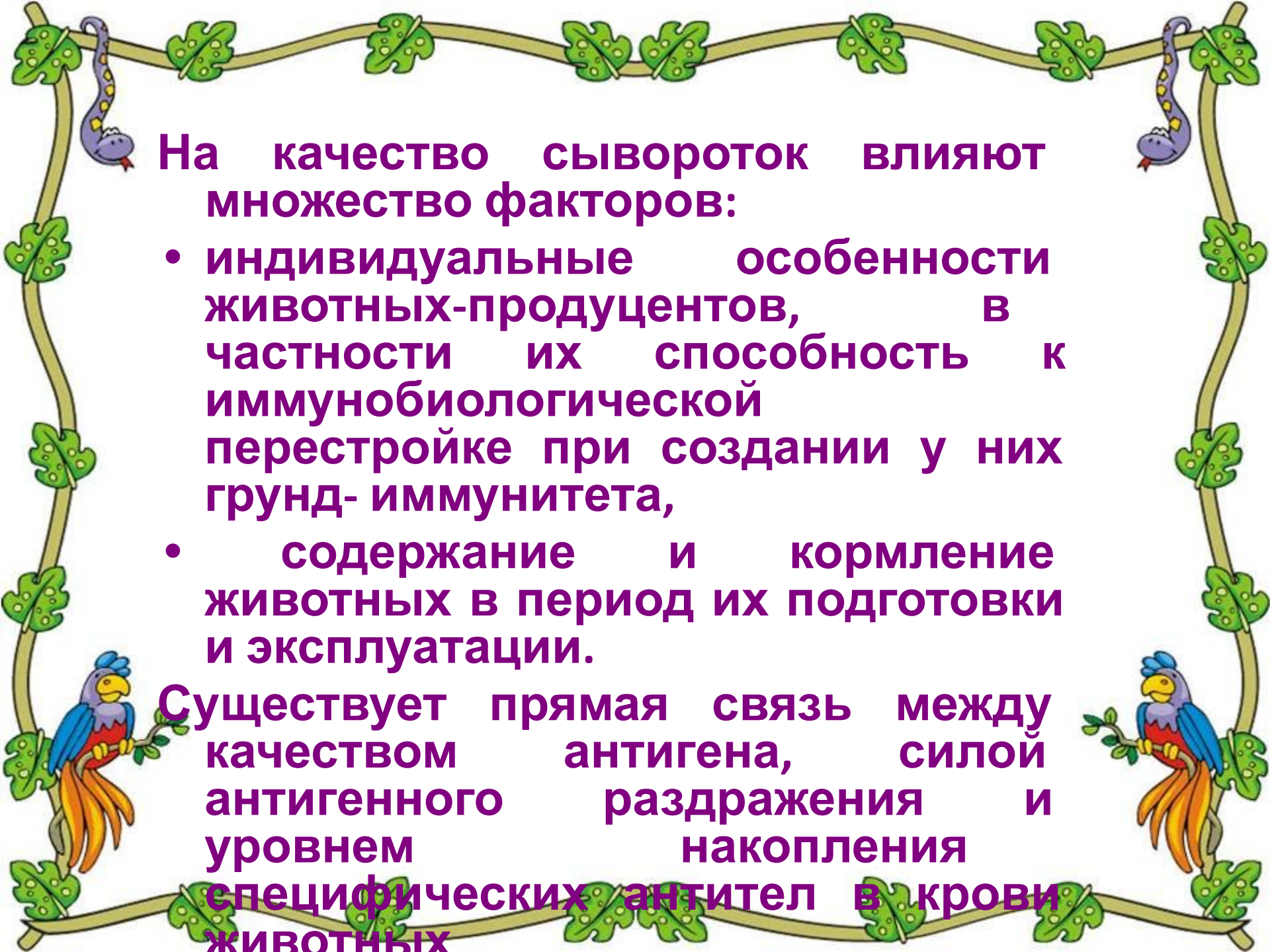
Наиболее подходящим видом считают лошадей, так как они отличаются высокой иммунологической реактивностью к большинству необходимых антигенов. От них также, в сравнительно короткий срок, можно получить сыворотку, содержащую высоко аффинные специфические антитела в достаточно высоких титрах. Преимуществом их является и то, что они удобны в отношении технических манипуляций и ухода.



Для изготовления **диагностических сывороток**, требующихся в значительно меньших количествах, используют более мелких животных - овец, коз, кроликов, реже морских свинок и крыс, а также птиц - петухов, уток, голубей.



Животные должны приобретаться из хозяйств, благополучных по инфекционным заболеваниям, свободных от лейкоза и быть здоровыми, в возрасте от 1 года до 3 лет.



На качество сывороток влияют множество факторов:

- индивидуальные особенности животных-продуцентов, в частности их способность к иммунобиологической перестройке при создании у них грунд-иммунитета,
- содержание и кормление животных в период их подготовки и эксплуатации.

Существует прямая связь между качеством антигена, силой антигенного раздражения и уровнем накопления специфических антител в крови животных

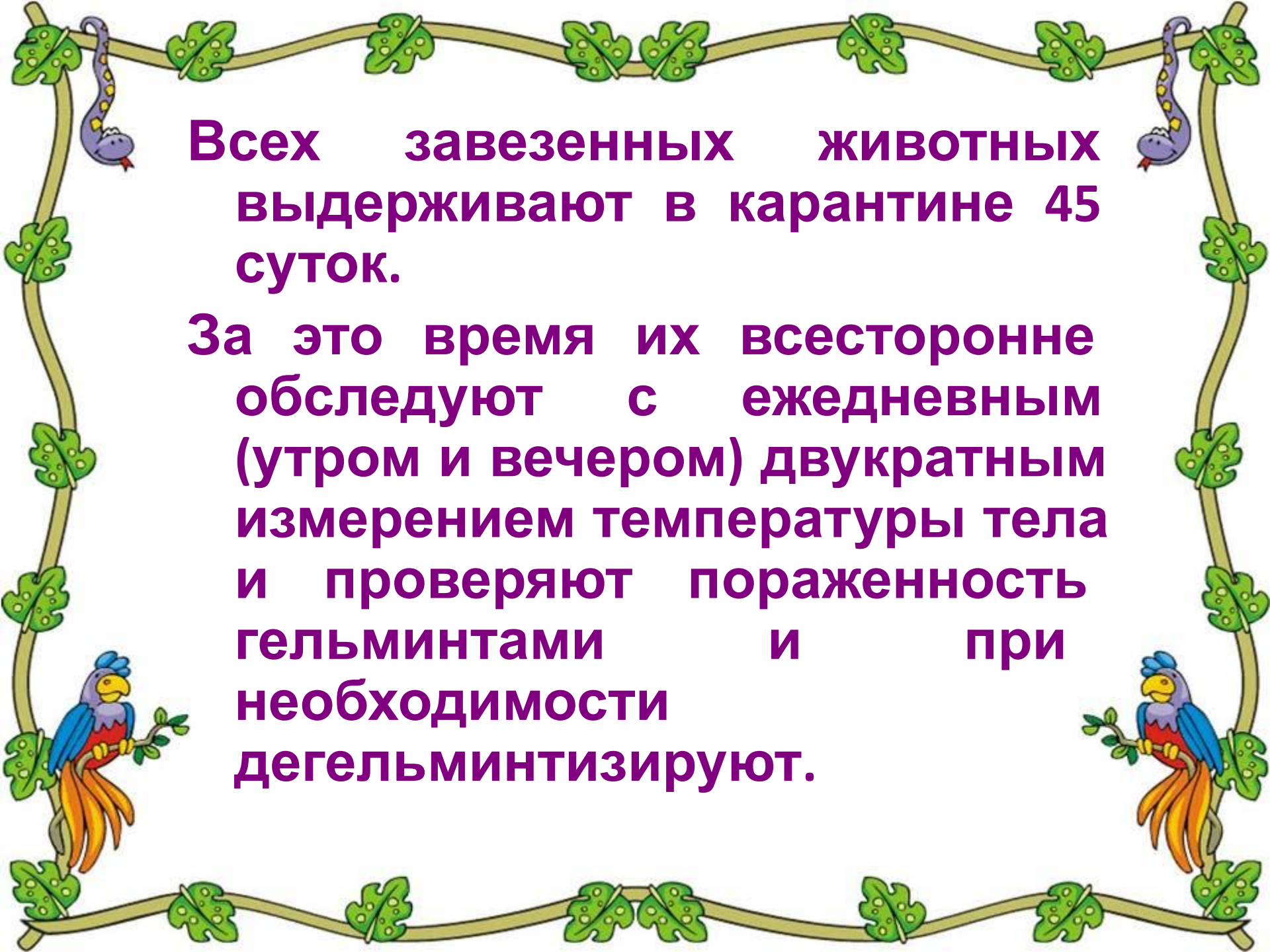


Требования к животным

Животных, применяемых для получения сывороток, завозят из стационарно благополучных по заразным заболеваниям районов.

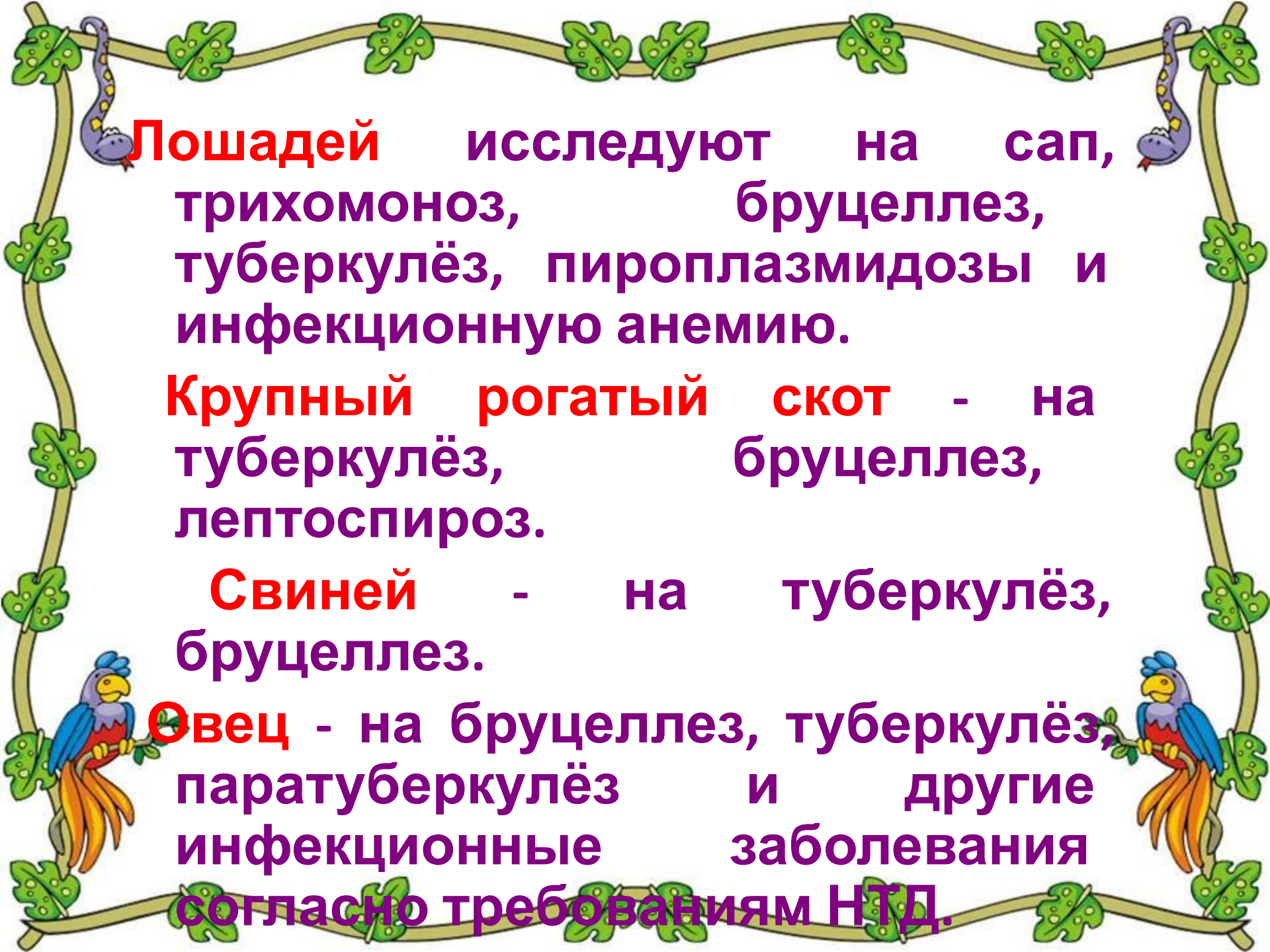
Они должны быть клинически здоровыми, средней и выше средней упитанности, свободными от кожных препаратов.





**Всех завезенных животных
выдерживают в карантине 45
суток.**

**За это время их всесторонне
обследуют с ежедневным
(утром и вечером) двукратным
измерением температуры тела
и проверяют пораженность
гельминтами и при
необходимости
дегельминтизируют.**

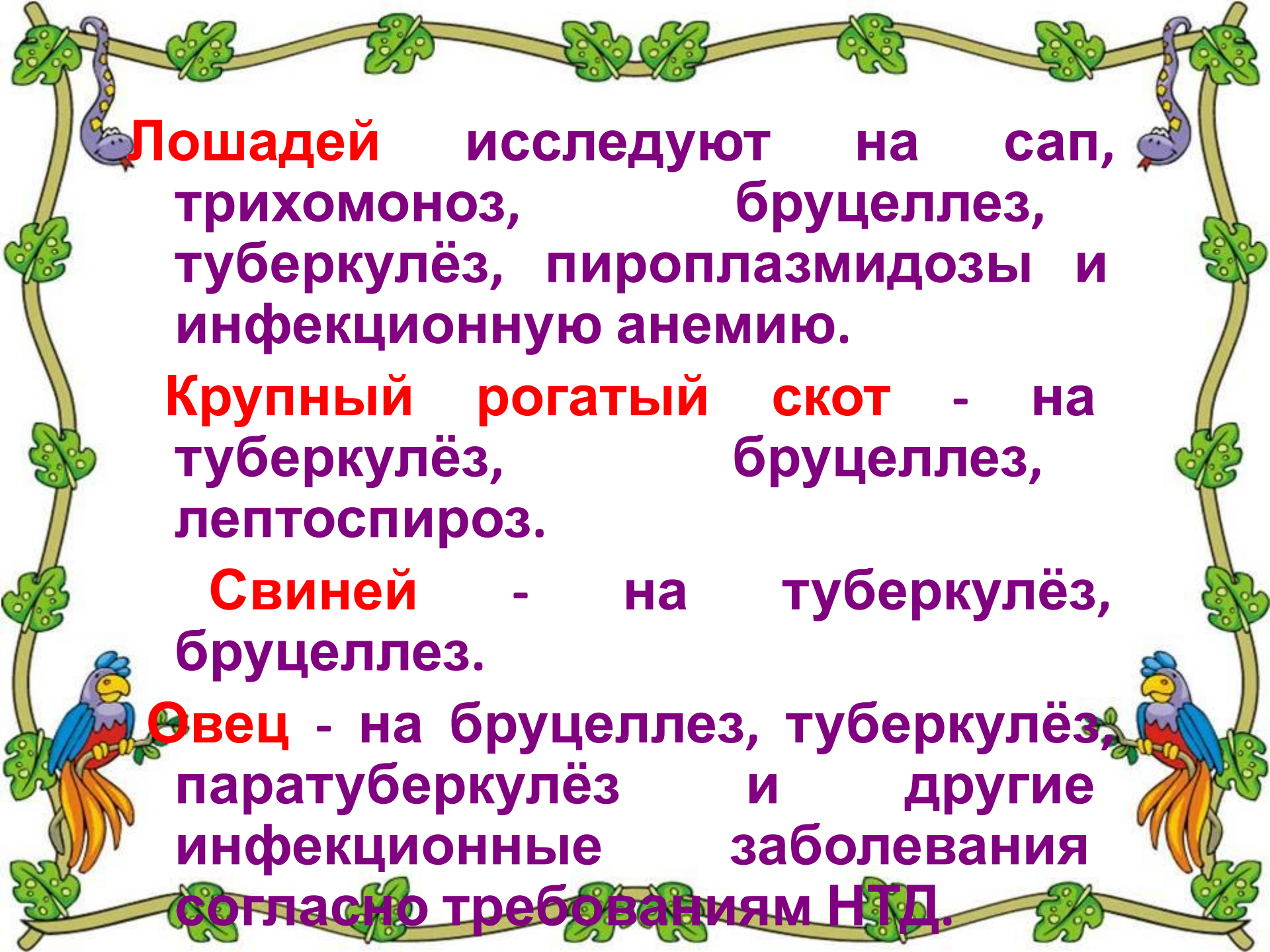


Лошадей исследуют на сап,
трихомоноз, бруцеллез,
туберкулёз, пироплазмидозы и
инфекционную анемию.

Крупный рогатый скот - на
туберкулёз, бруцеллез,
лептоспироз.

Свиней - на туберкулёз,
бруцеллез.

Овец - на бруцеллез, туберкулёз,
паратуберкулёз и другие
инфекционные заболевания
согласно требованиям НТД.





При отборе животных-продуцентов надо учитывать их физиологические и иммунологические показатели.

На активность лечебно-профилактических и диагностических сывороток влияют порода, пол, конструкция и возраст животного.

Лошадей используют в возрасте от 3 до 12 лет, помеси донской и казахской пород, массой 450-500 кг.

Волов - в возрасте от 3 до 8 лет, массой не менее 350 кг, красно-степной, калмыцкой, симментальской, швицкой астраханской пород.

Свиней - в возрасте 5-6 месяцев, массой не менее 80 кг, крупной белой породы.

Овец, баранов и валухов - в возрасте 2-3 лет и массой 30-45 кг (для получения диагностических сывороток и сывороточных сред).



Введение антигенов и периодическое кровопускание приводит к нарушению обмена веществ и анемии, в последующем к снижению титров антител, большое внимание нужно уделять вопросам полноценного, сбалансированного кормления животных-продуцентов.

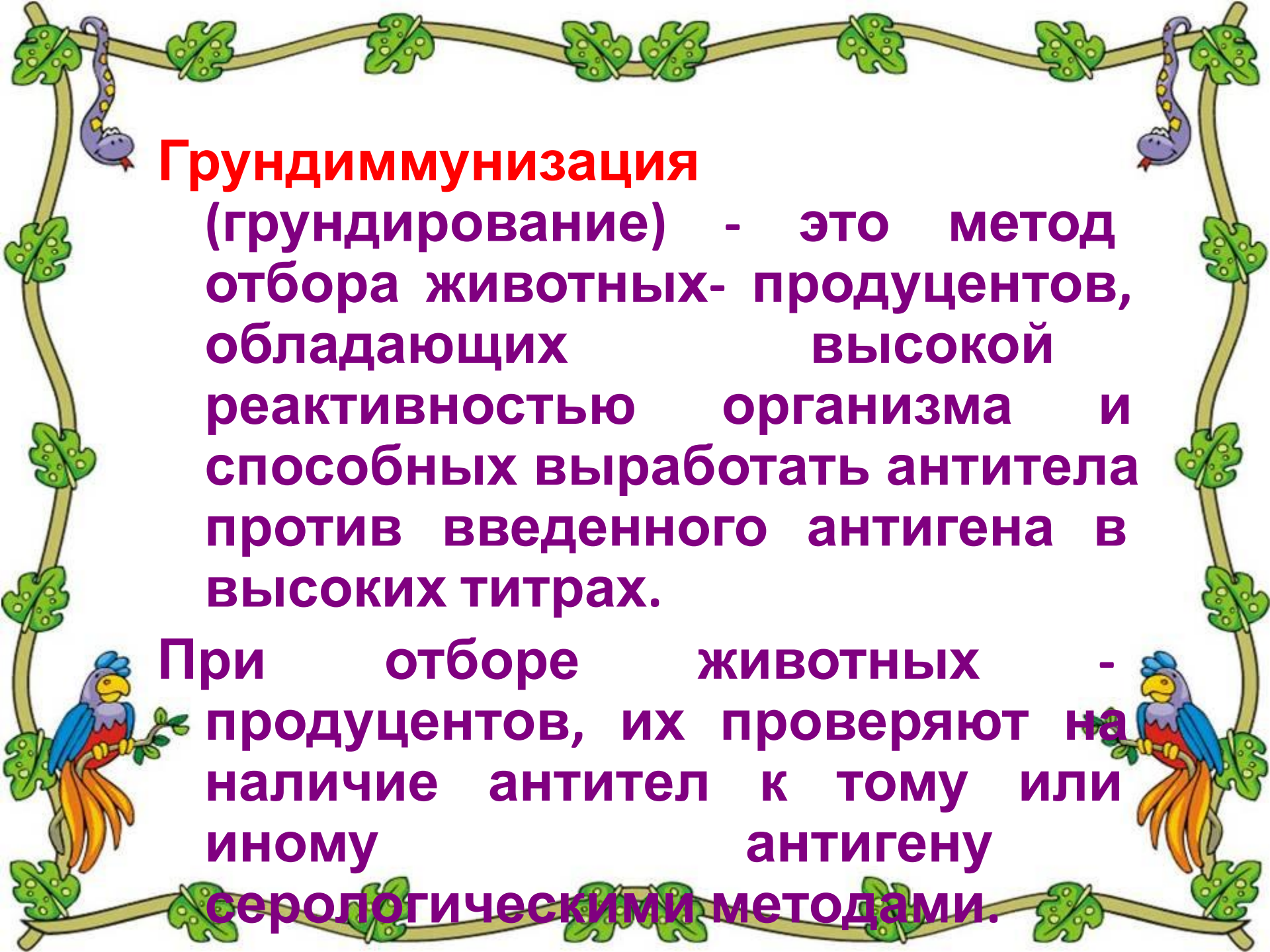


Рационы для них должны содержать по 11-12 кормовых единиц и по 1000-1200 грамм перевариваемого протеина, они должны включать сочно-витаминные корма и быть сбалансированными по минеральному составу.

Для восстановления крови после крововзятия немаловажное значение имеет правильно организованное минеральное кормление животных- производителей: на 1 кг сухого кормового рациона лошадей должно приходиться: железа 145-165 мг, меди-15-18 мг, кобальта 1,2-1,4 мг, марганца - не менее 9 мг.

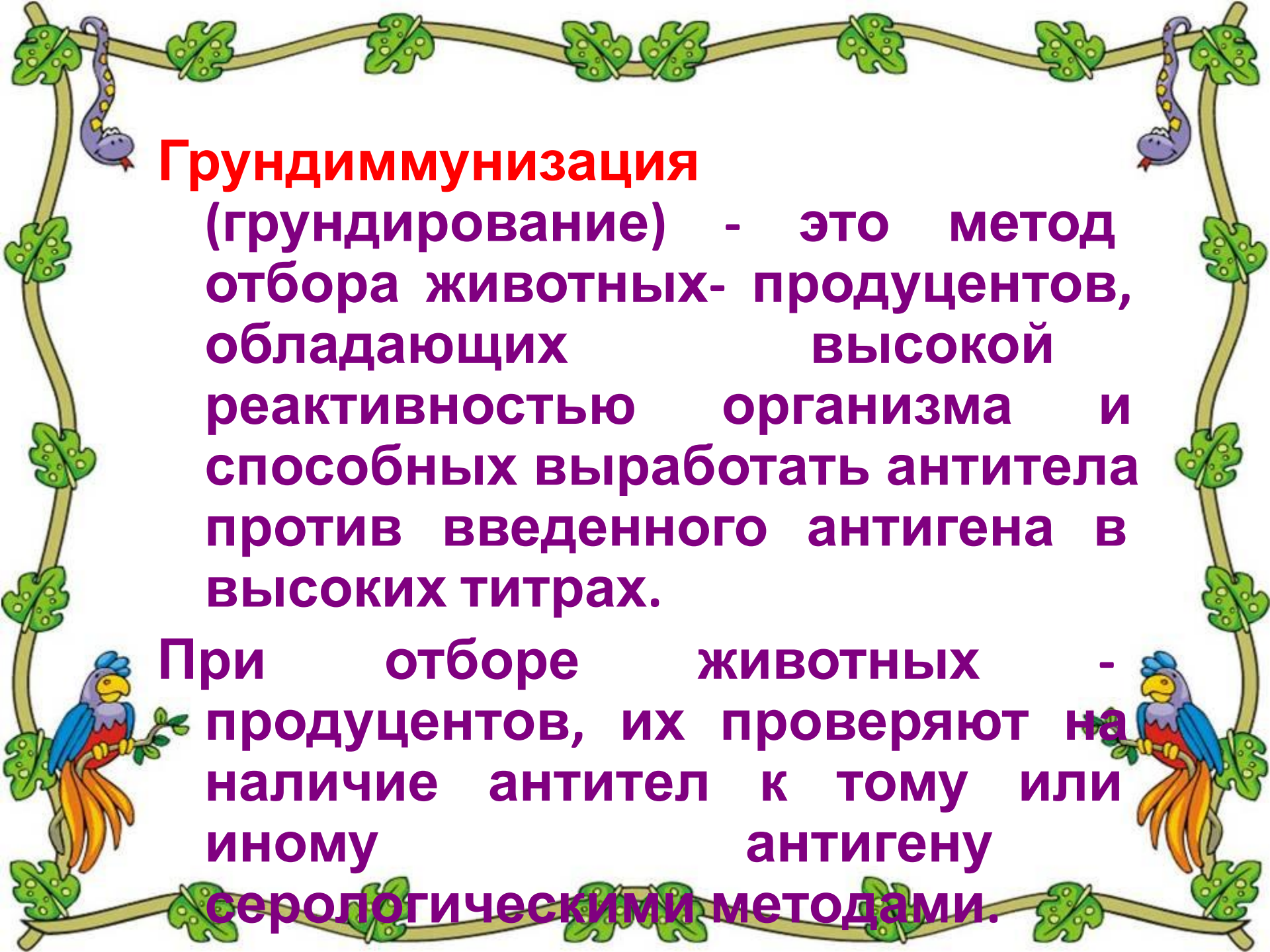


Для восстановления красной крови лошадям вводят в рацион эритроциты, фибрин, кормовые антибиотики, проращенный овес. Кормят животных-производителей 3-5 раз в день. Крупных животных содержат индивидуально, мелкий рогатый скот и свиней - группами.

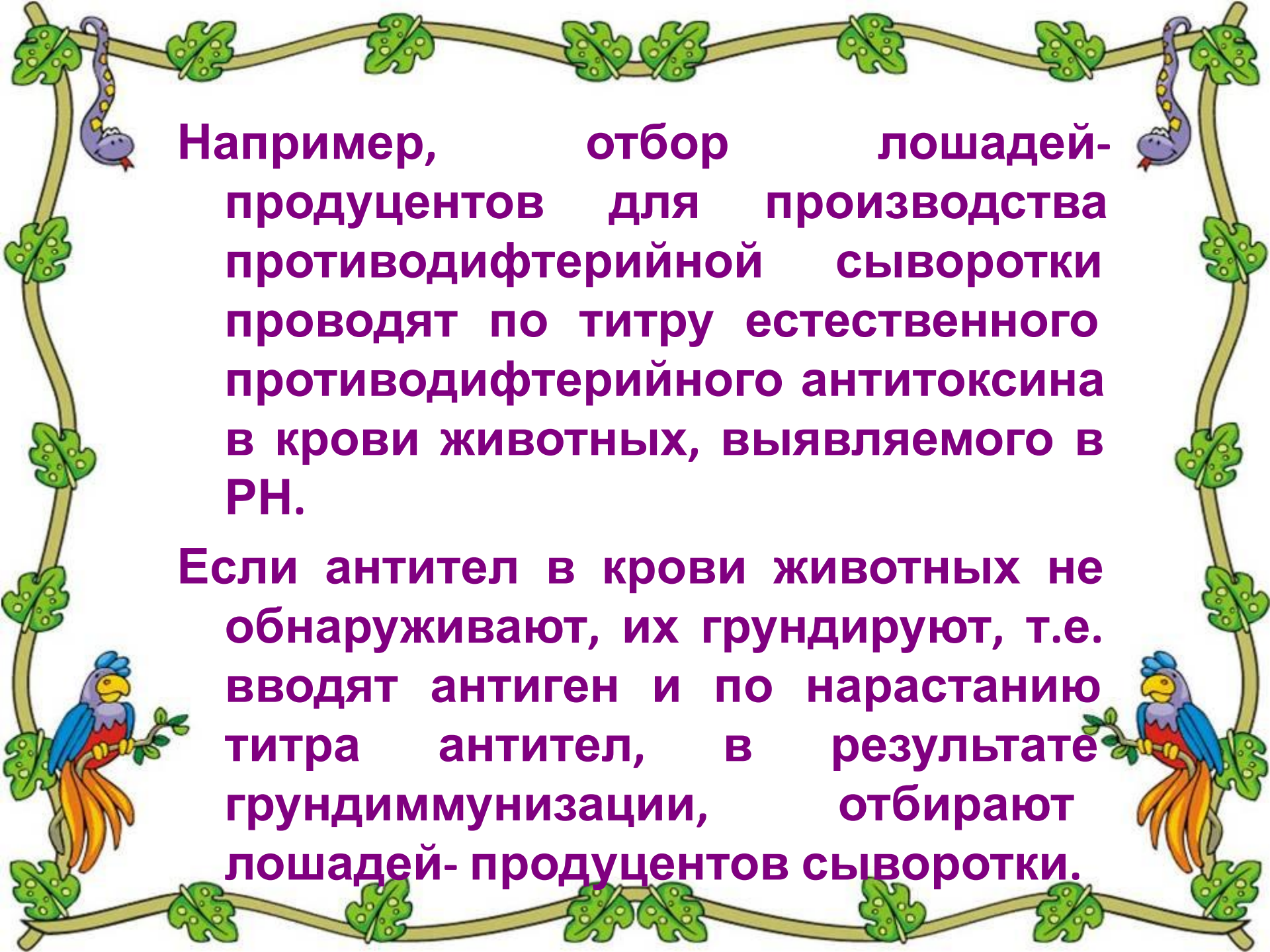


Грундиммунизация

(грунди́рование) - это метод отбора животных- продуцентов, обладающих высокой реактивностью организма и способных выработать антитела против введенного антигена в высоких титрах.



При отборе животных - продуцентов, их проверяют на наличие антител к тому или иному антигену серологическими методами.



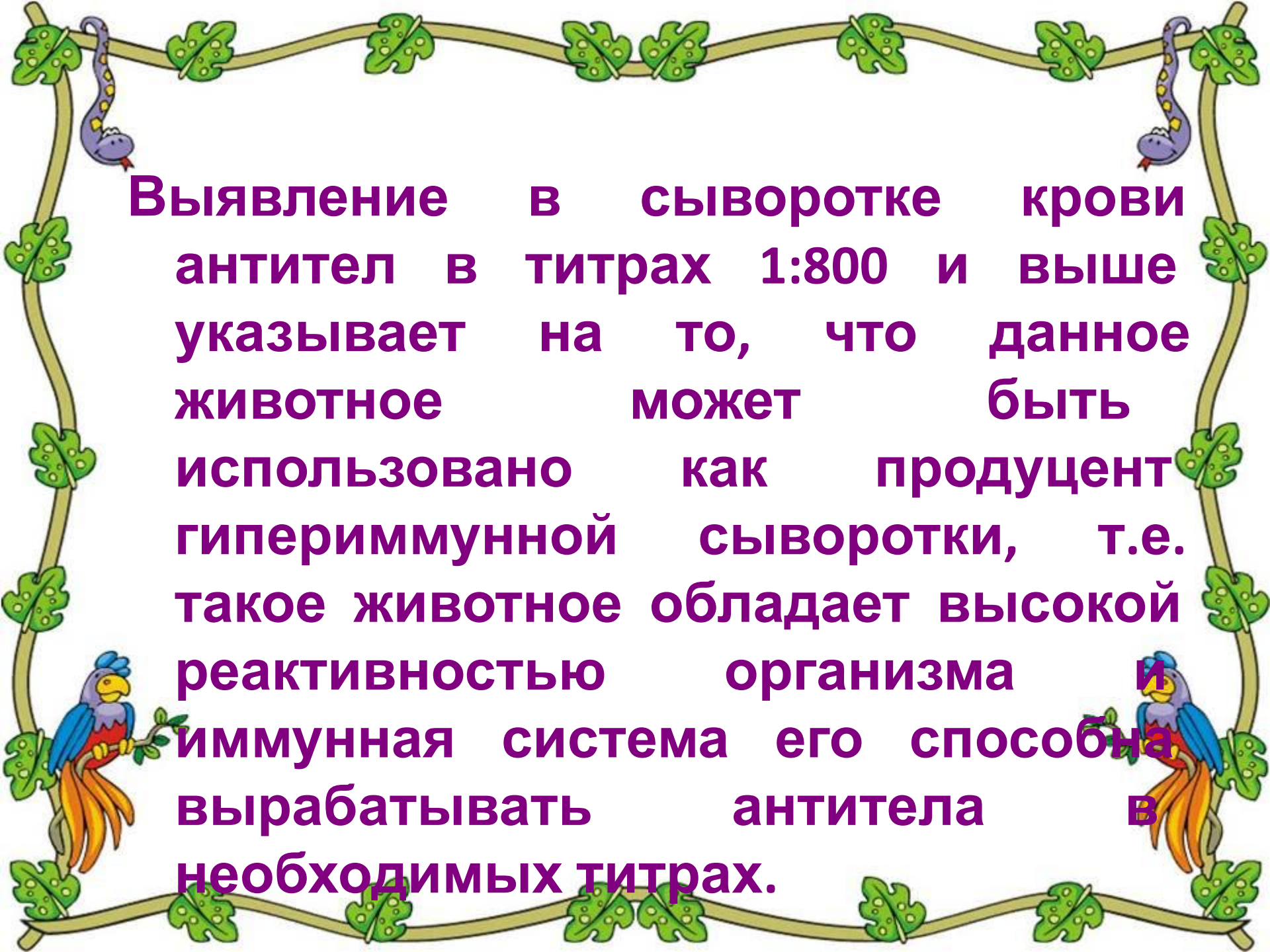
Например, отбор лошадей-продуцентов для производства противодифтерийной сыворотки проводят по титру естественного противодифтерийного антитоксина в крови животных, выявляемого в РН.

Если антител в крови животных не обнаруживают, их грундируют, т.е. вводят антиген и по нарастанию титра антител, в результате грундиммунизации, отбирают лошадей-продуцентов сыворотки.



При проведении грундиммунизации животным дважды вводят убитый антиген или живые аттенуированные микроорганизмы (убитые или живые вакцины), с интервалом в 2-3 недели, внутримышечно или подкожно.

До начала грундиммунизации и через 7-8 суток после последнего введения антигена у животных берут кровь и определяют в ее сыворотке наличие антител к тому антигену, с помощью которого в последующем готовят гипериммунную сыворотку.

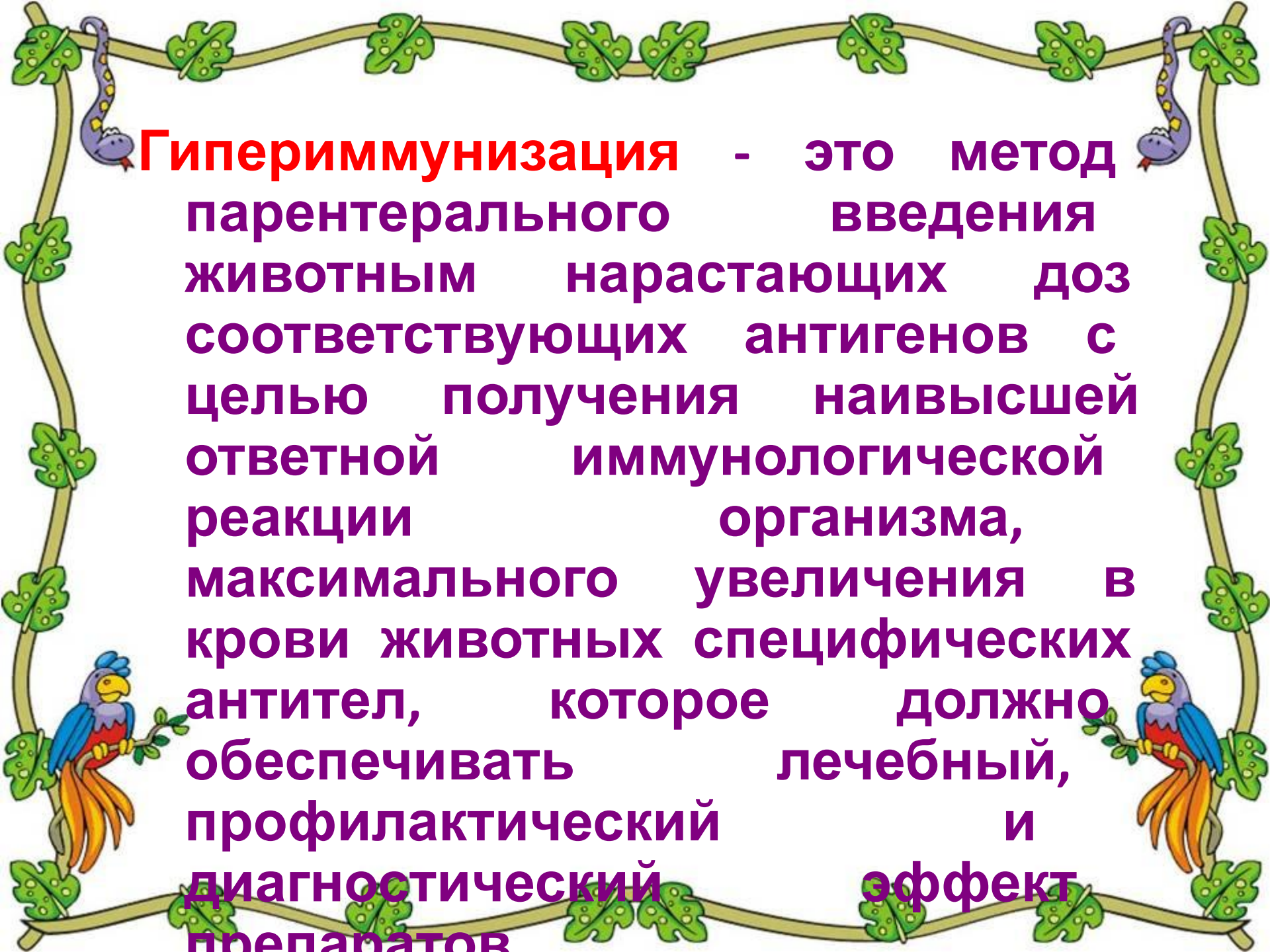


Выявление в сыворотке крови
антител в титрах 1:800 и выше
указывает на то, что данное
животное может быть
использовано как продуцент
гипериммунной сыворотки, т.е.
такое животное обладает высокой
реактивностью организма и
иммунная система его способна
вырабатывать антитела в
необходимых титрах.

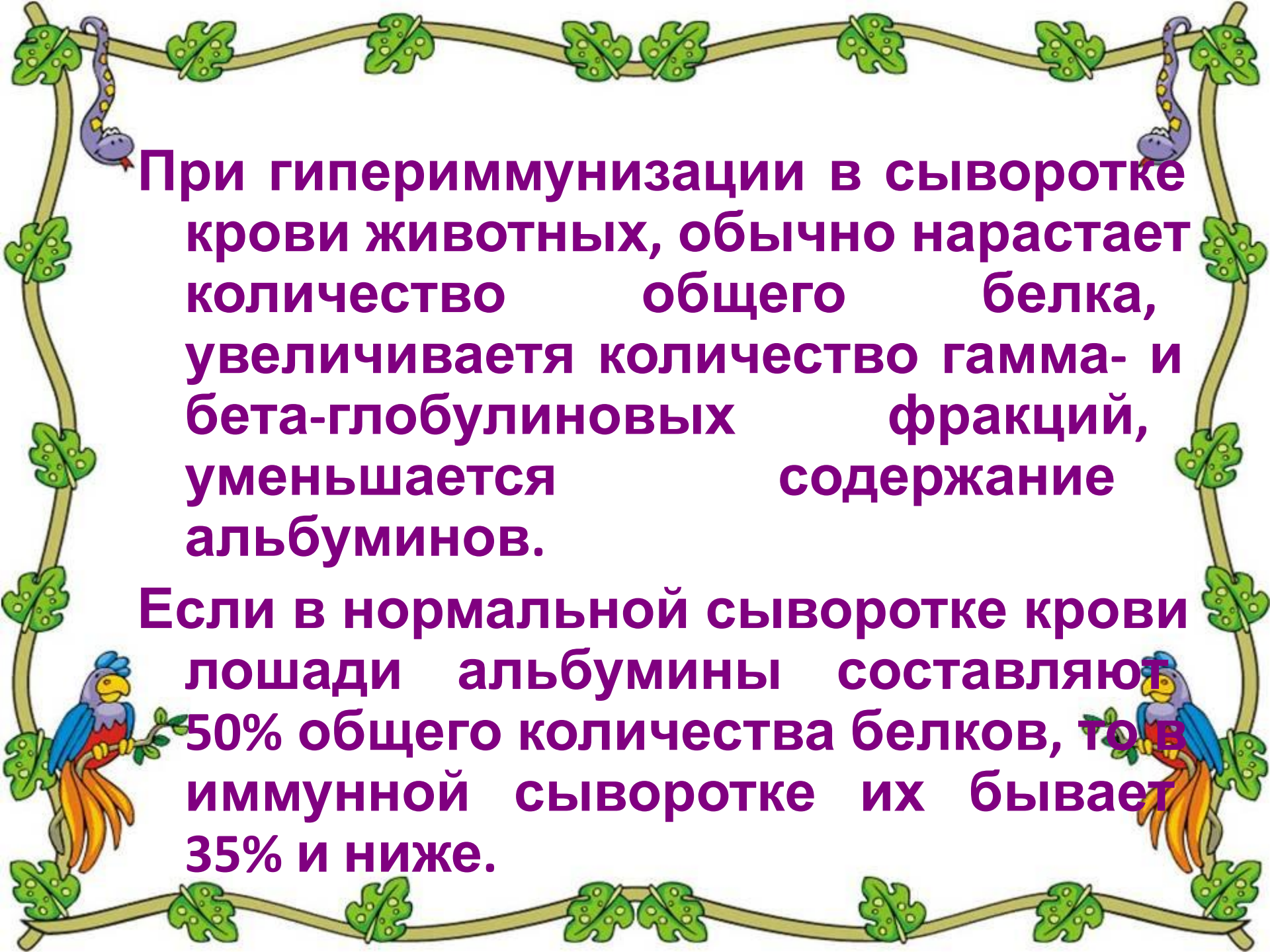


Предварительное, правильно проведенное грунди́рование животных обеспечивает повышение (в 5 раз и более) титров специфических антител при последующей гиперимунизации тем же антигеном, увеличивает выход высокоактивного препарата и создает условия получения сывороток в более короткие сроки.

Всех животных, у которых при грундиниммунизации не обнаруживают достаточного уровня антител или обнаруживают в титре ниже необходимого 1:800, подвергают

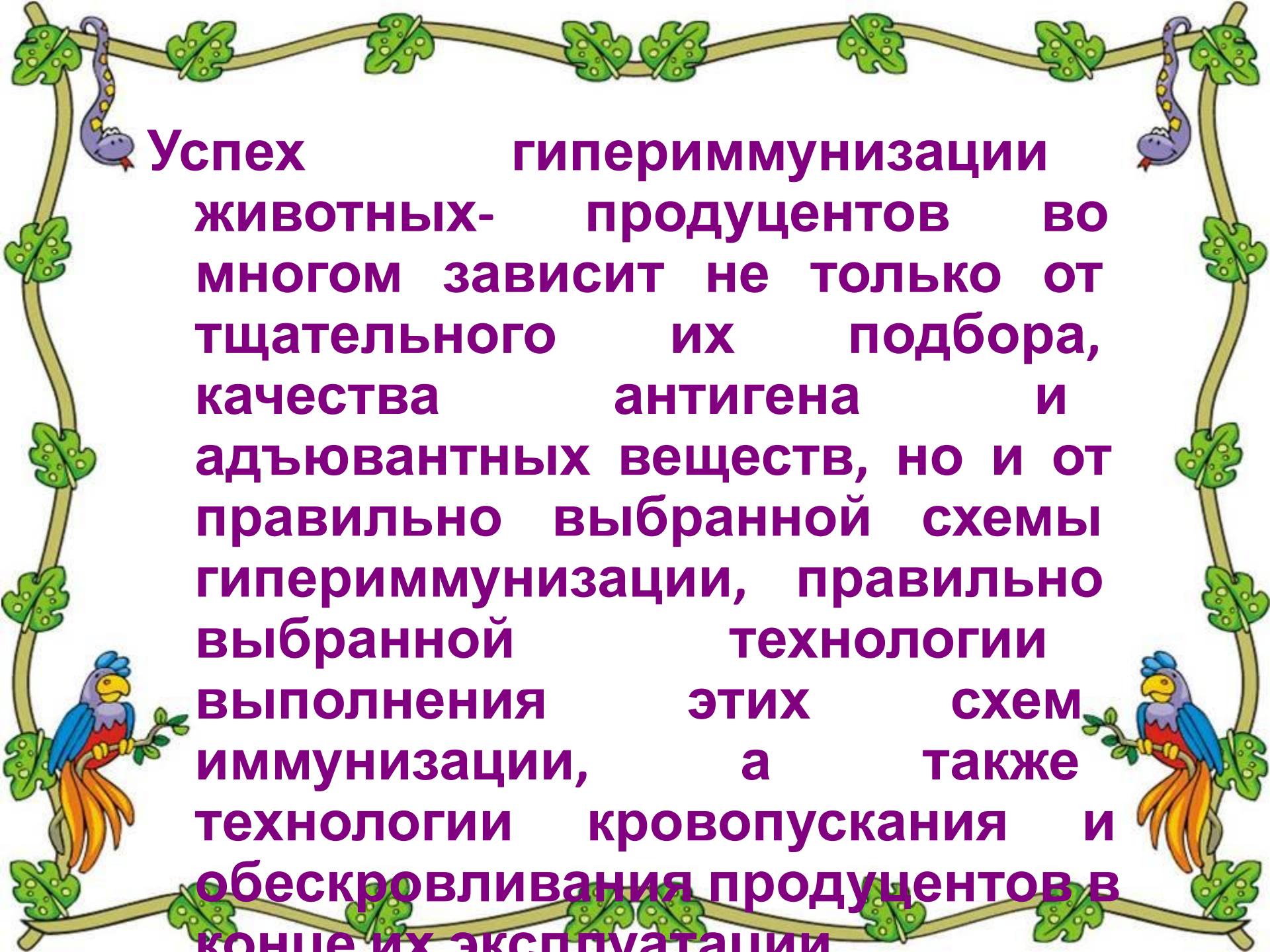


Гипериммунизация - это метод парентерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов

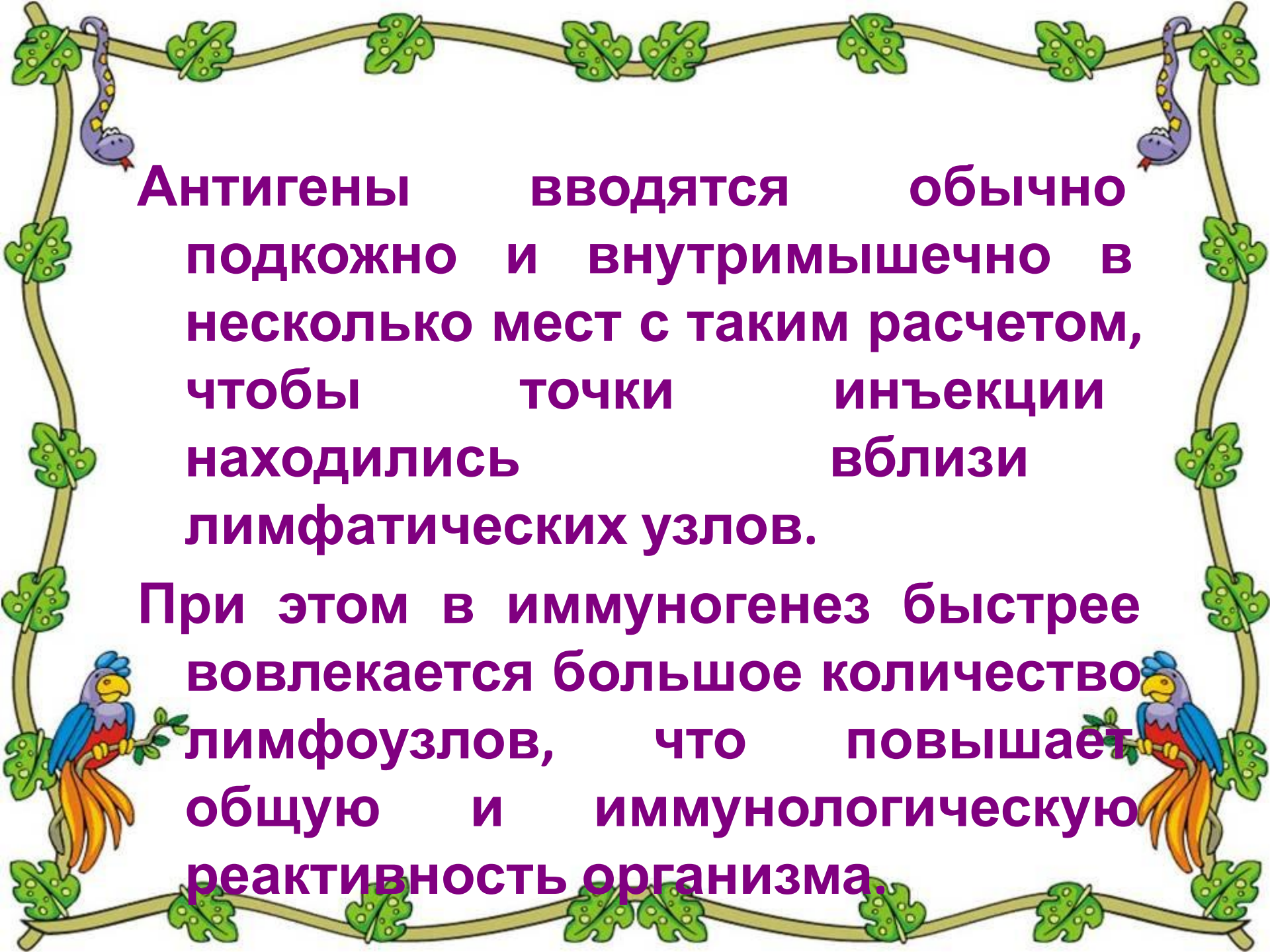


При гипериммунизации в сыворотке крови животных, обычно нарастает количество общего белка, увеличивается количество гамма- и бета-глобулиновых фракций, уменьшается содержание альбуминов.

Если в нормальной сыворотке крови лошади альбумины составляют 50% общего количества белков, то в иммунной сыворотке их бывает 35% и ниже.

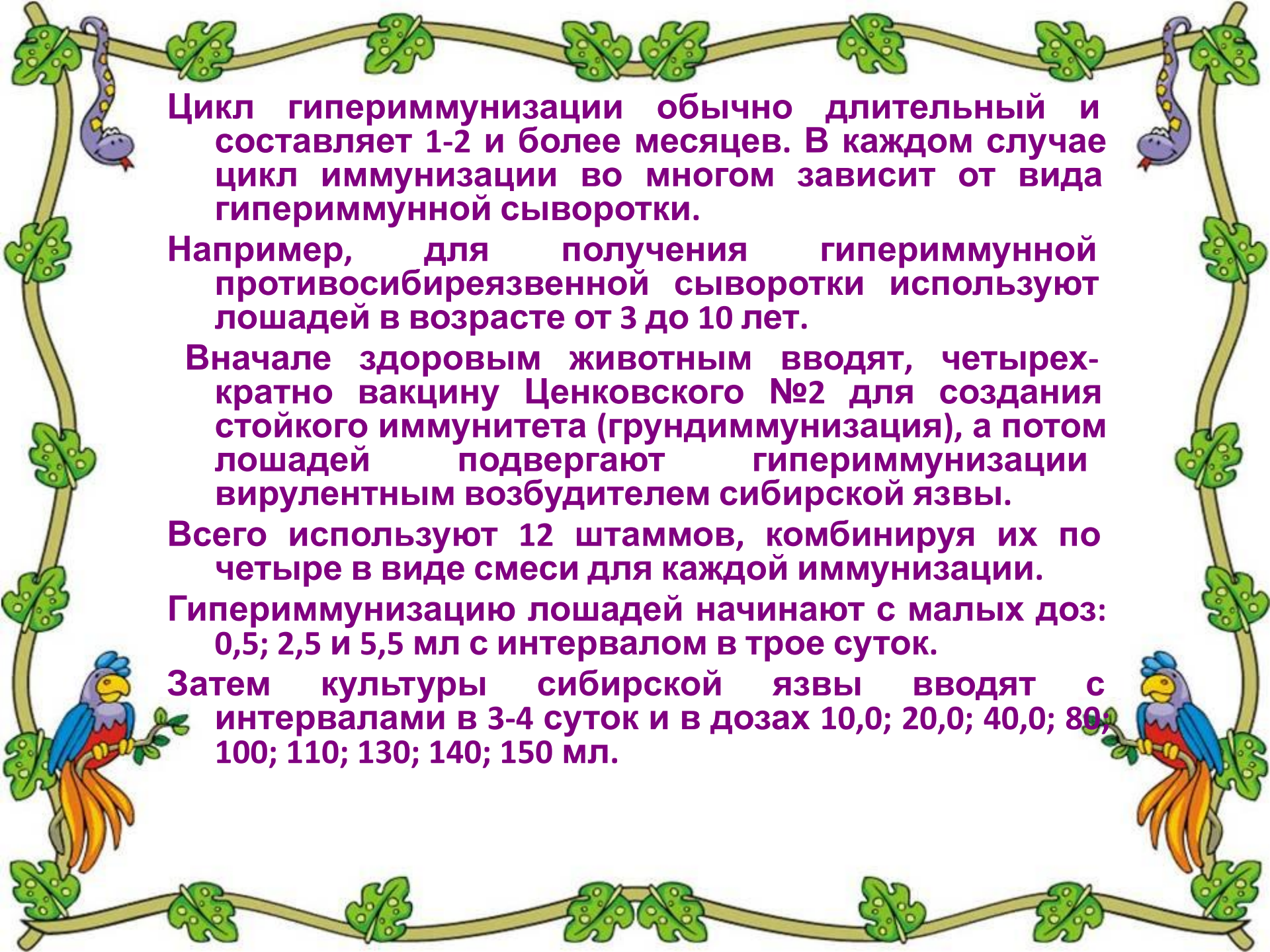


Успех гипериммунизации животных- продуцентов во многом зависит не только от тщательного их подбора, качества антигена и адъювантных веществ, но и от правильно выбранной схемы гипериммунизации, правильно выбранной технологии выполнения этих схем иммунизации, а также технологии кровопускания и обескровливания продуцентов в конце их эксплуатации



Антигены вводятся обычно подкожно и внутримышечно в несколько мест с таким расчетом, чтобы точки инъекции находились вблизи лимфатических узлов.

При этом в иммуногенез быстрее вовлекается большое количество лимфоузлов, что повышает общую и иммунологическую реактивность организма.



Цикл гипериммунизации обычно длительный и составляет 1-2 и более месяцев. В каждом случае цикл иммунизации во многом зависит от вида гипериммунной сыворотки.

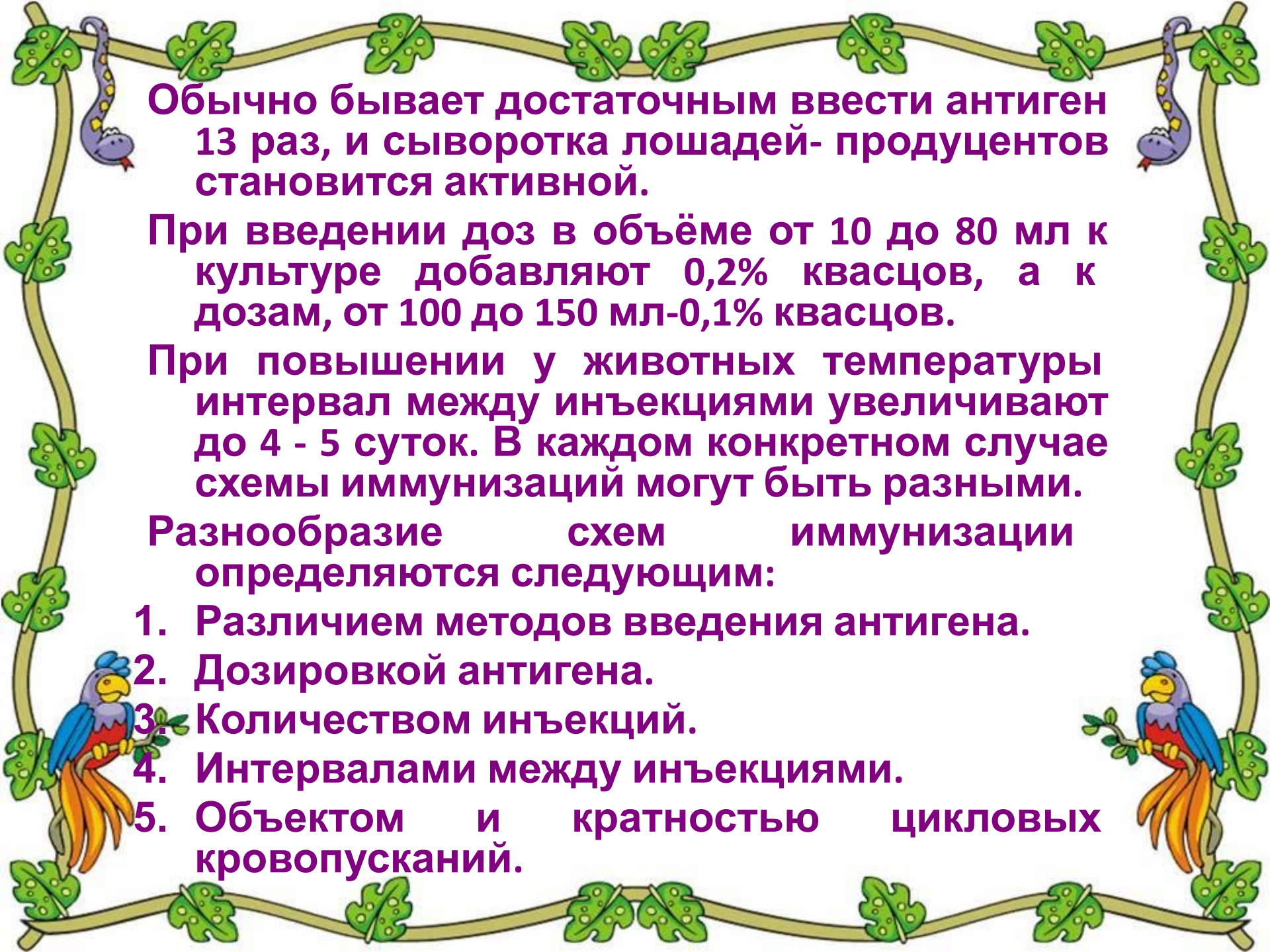
Например, для получения гипериммунной противосибиреязвенной сыворотки используют лошадей в возрасте от 3 до 10 лет.

Вначале здоровым животным вводят, четырехкратно вакцину Ценковского №2 для создания стойкого иммунитета (грундиммунизация), а потом лошадей подвергают гипериммунизации вирулентным возбудителем сибирской язвы.

Всего используют 12 штаммов, комбинируя их по четыре в виде смеси для каждой иммунизации.

Гипериммунизацию лошадей начинают с малых доз: 0,5; 2,5 и 5,5 мл с интервалом в трое суток.

Затем культуры сибирской язвы вводят с интервалами в 3-4 суток и в дозах 10,0; 20,0; 40,0; 80; 100; 110; 130; 140; 150 мл.



Обычно бывает достаточно ввести антиген 13 раз, и сыворотка лошадей- продуцентов становится активной.

При введении доз в объёме от 10 до 80 мл к культуре добавляют 0,2% квасцов, а к дозам, от 100 до 150 мл-0,1% квасцов.

При повышении у животных температуры интервал между инъекциями увеличивают до 4 - 5 суток. В каждом конкретном случае схемы иммунизаций могут быть разными.

Разнообразие схем иммунизации определяются следующим:

1. Различием методов введения антигена.
2. Дозировкой антигена.
3. Количеством инъекций.
4. Интервалами между инъекциями.
5. Объектом и кратностью цикловых кровопусканий.

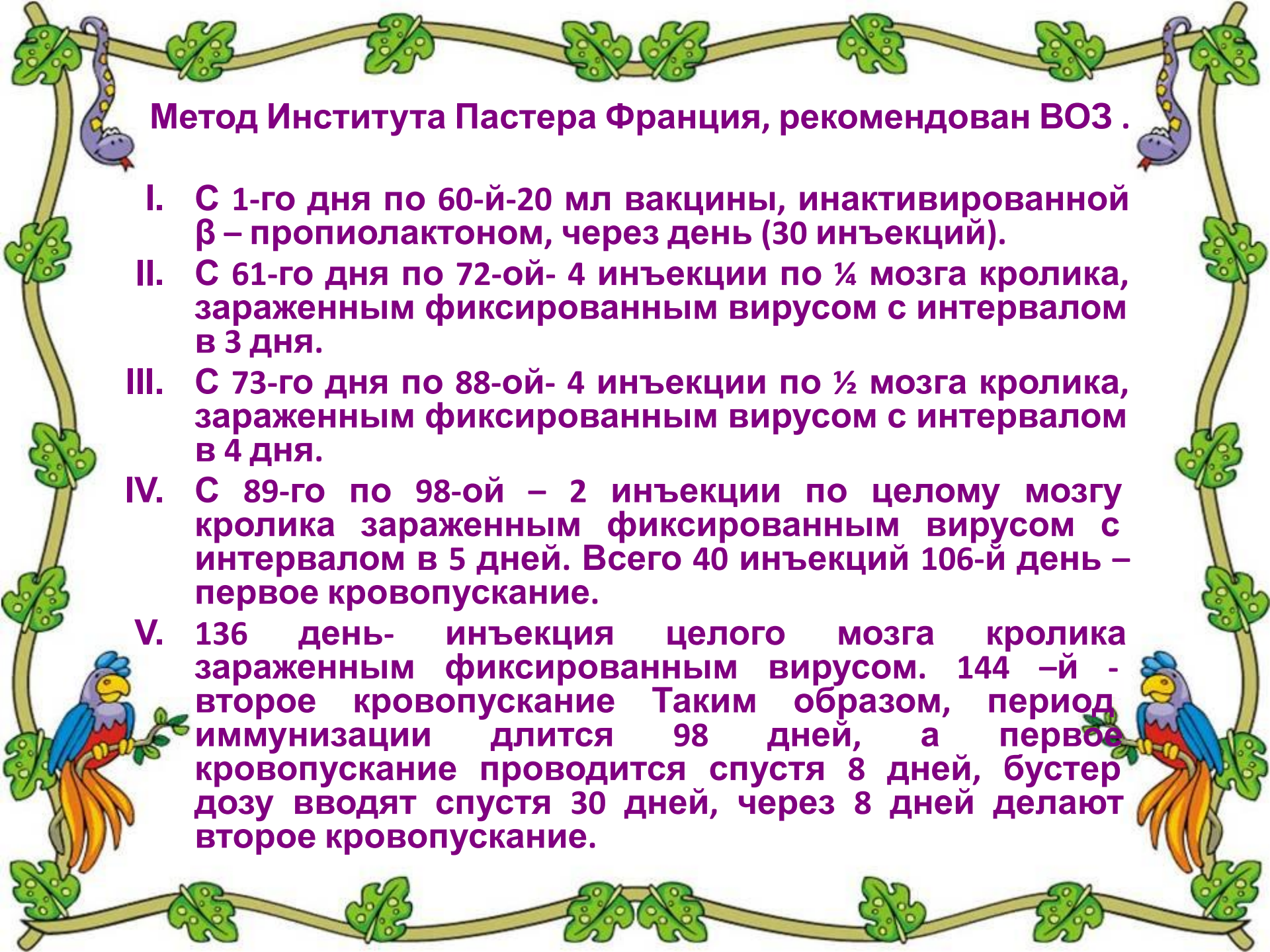


Введение антигенов обычно не вызывает резких отклонений в состоянии здоровья животных, лишь иногда наблюдается местные и общие реакции.

Эффективность иммунизации животных повышается при дробном введении антигенов одновременно в различные участки тела животного.

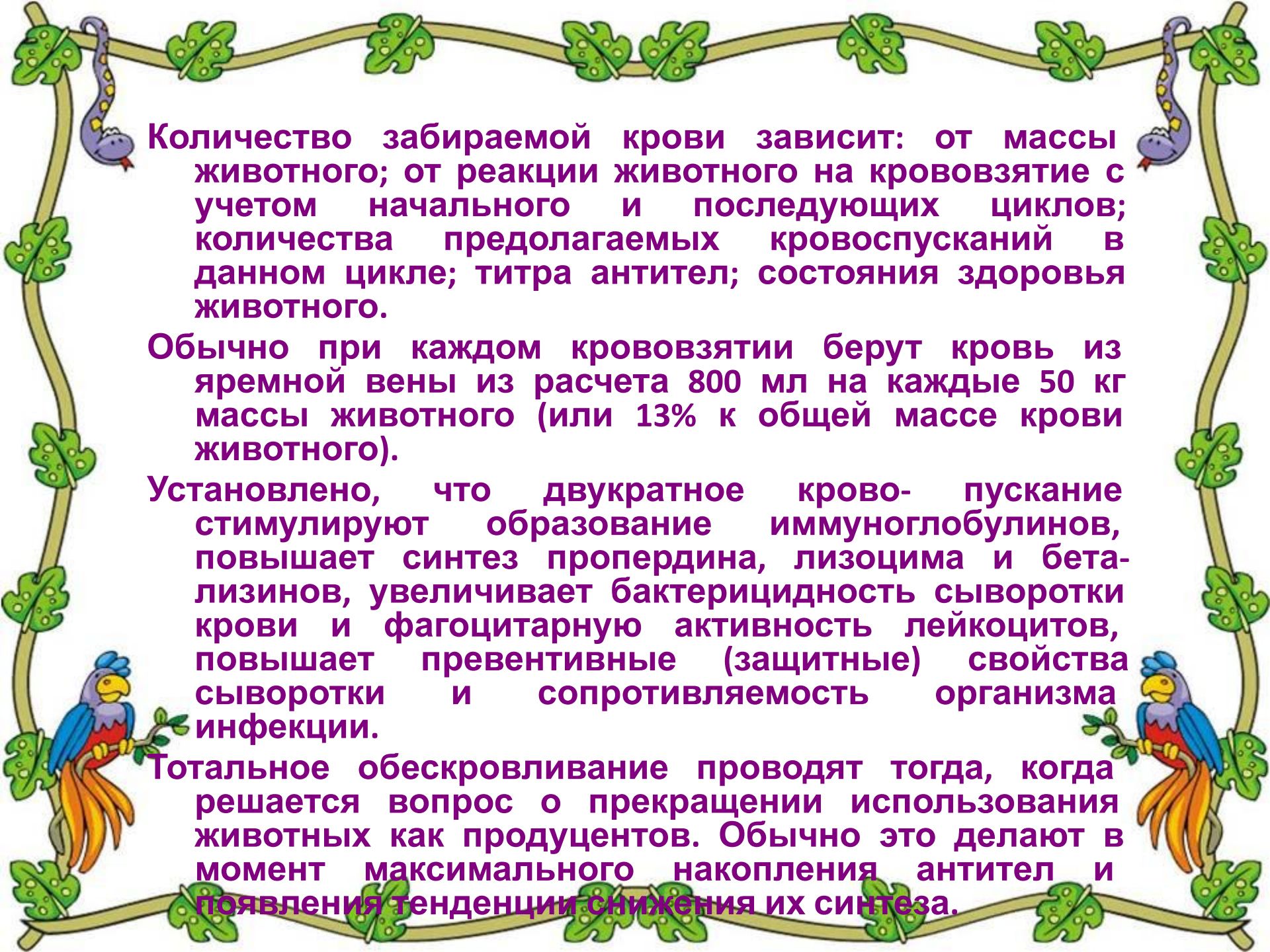
По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител, у него берут кровь обычно через 7-8 суток после последней инъекции антигена.

Приведем пример получения антирабической сыворотки (применяется для лечения людей).



Метод Института Пастера Франция, рекомендован ВОЗ .

- I. С 1-го дня по 60-й-20 мл вакцины, инактивированной β – пропиолактоном, через день (30 инъекций).
- II. С 61-го дня по 72-ой- 4 инъекции по $\frac{1}{4}$ мозга кролика, зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 3 дня.
- III. С 73-го дня по 88-ой- 4 инъекции по $\frac{1}{2}$ мозга кролика, зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 4 дня.
- IV. С 89-го по 98-ой – 2 инъекции по целому мозгу кролика зараженным фиксированным вирусом с интервалом в 5 дней. Всего 40 инъекций 106-й день – первое кровопускание.
- V. 136 день- инъекция целого мозга кролика зараженным фиксированным вирусом. 144 –й - второе кровопускание Таким образом, период иммунизации длится 98 дней, а первое кровопускание проводится спустя 8 дней, бустер дозу вводят спустя 30 дней, через 8 дней делают второе кровопускание.

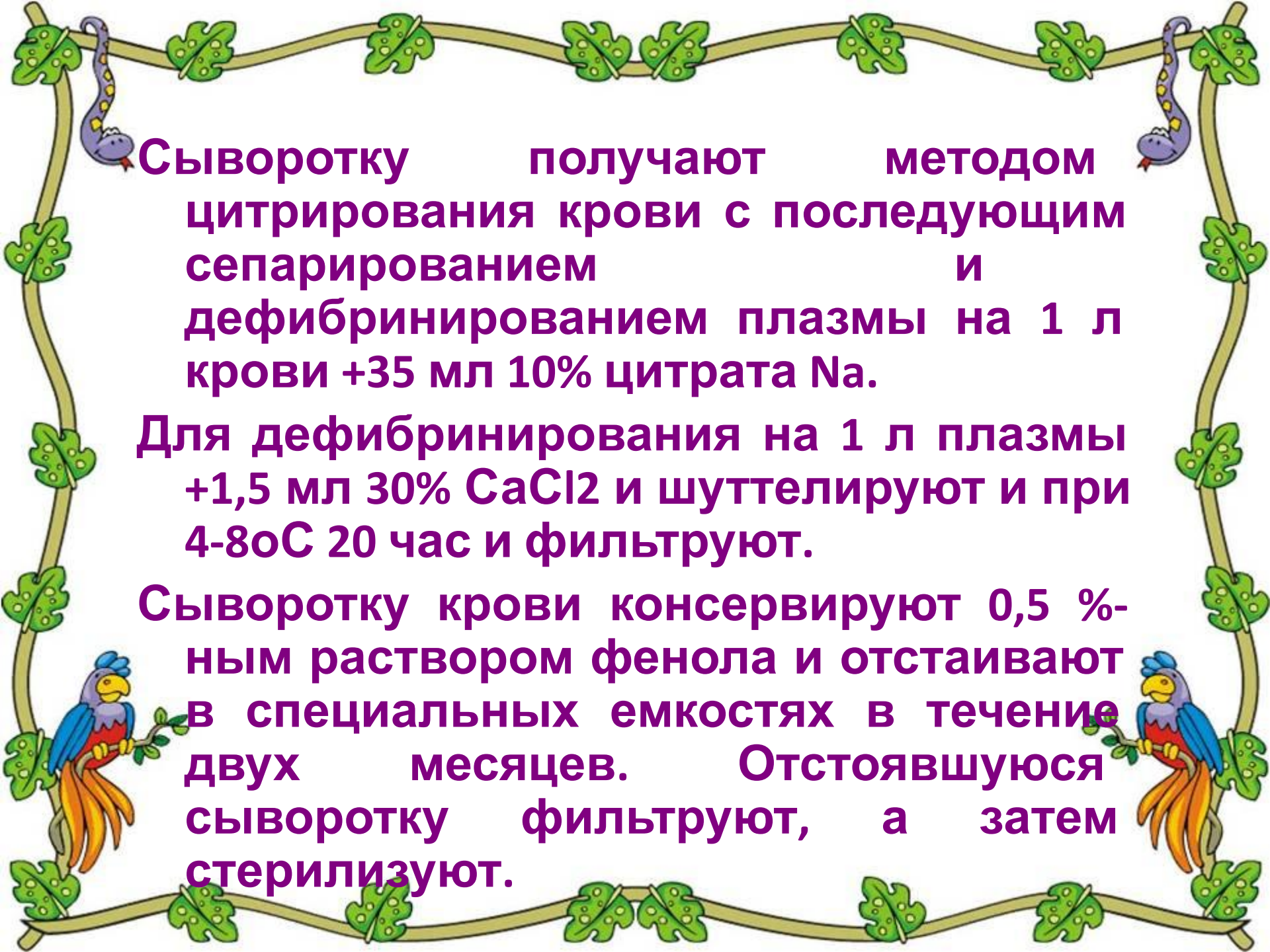


Количество забираемой крови зависит: от массы животного; от реакции животного на крововзятие с учетом начального и последующих циклов; количества преодолеваемых кровоспусков в данном цикле; титра антител; состояния здоровья животного.

Обычно при каждом крововзятии берут кровь из яремной вены из расчета 800 мл на каждые 50 кг массы животного (или 13% к общей массе крови животного).

Установлено, что двукратное кровопускание стимулируют образование иммуноглобулинов, повышает синтез пропердина, лизоцима и бета-лизинов, увеличивает бактерицидность сыворотки крови и фагоцитарную активность лейкоцитов, повышает превентивные (защитные) свойства сыворотки и сопротивляемость организма инфекции.

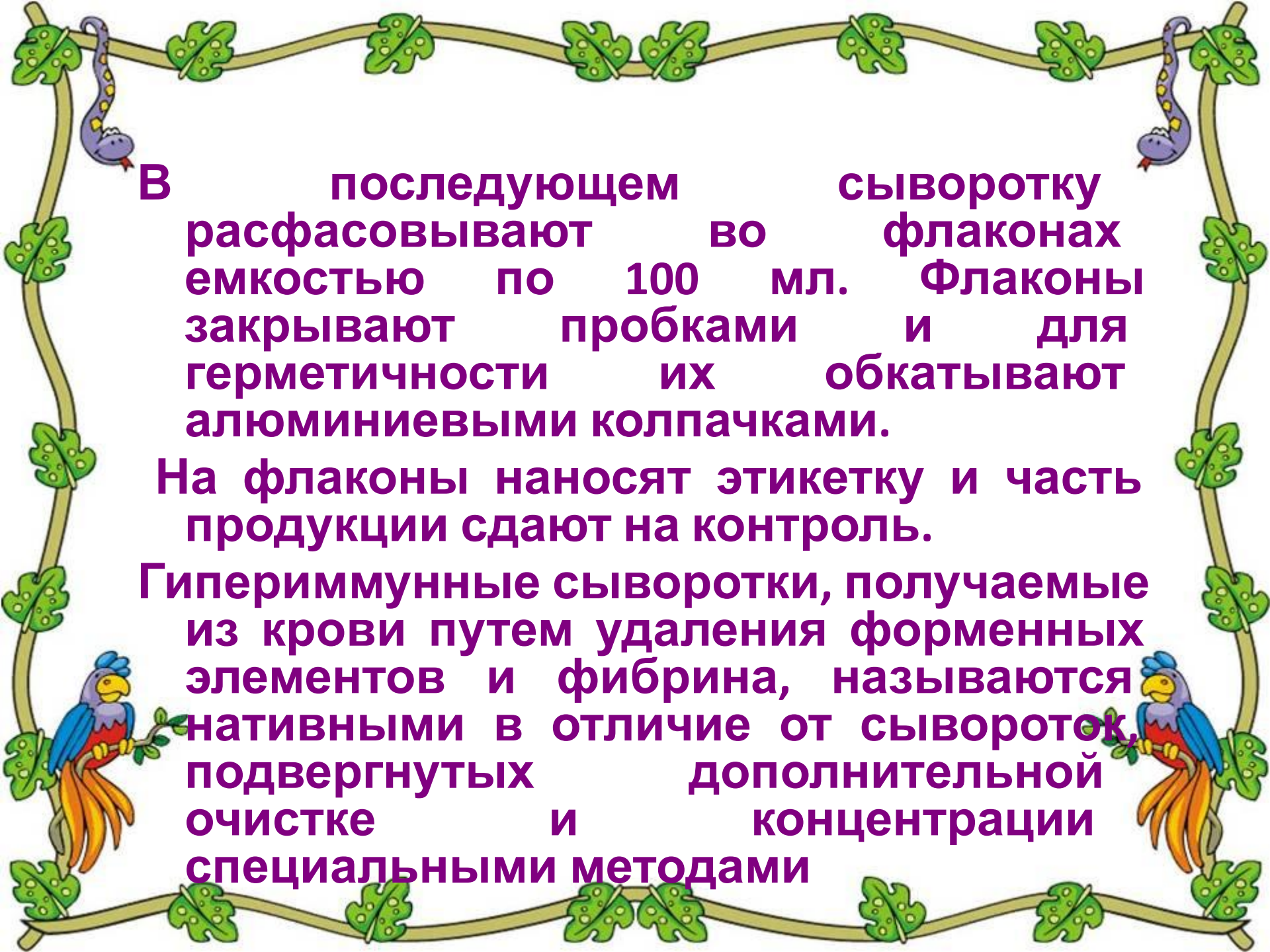
Тотальное обескровливание проводят тогда, когда решается вопрос о прекращении использования животных как продуцентов. Обычно это делают в момент максимального накопления антител и появления тенденции снижения их синтеза.



Сыворотку получают методом цитрирования крови с последующим сепарированием и дефибринованием плазмы на 1 л крови +35 мл 10% цитрата Na.

Для дефибринования на 1 л плазмы +1,5 мл 30% CaCl_2 и шуттелируют и при 4-8°C 20 час и фильтруют.

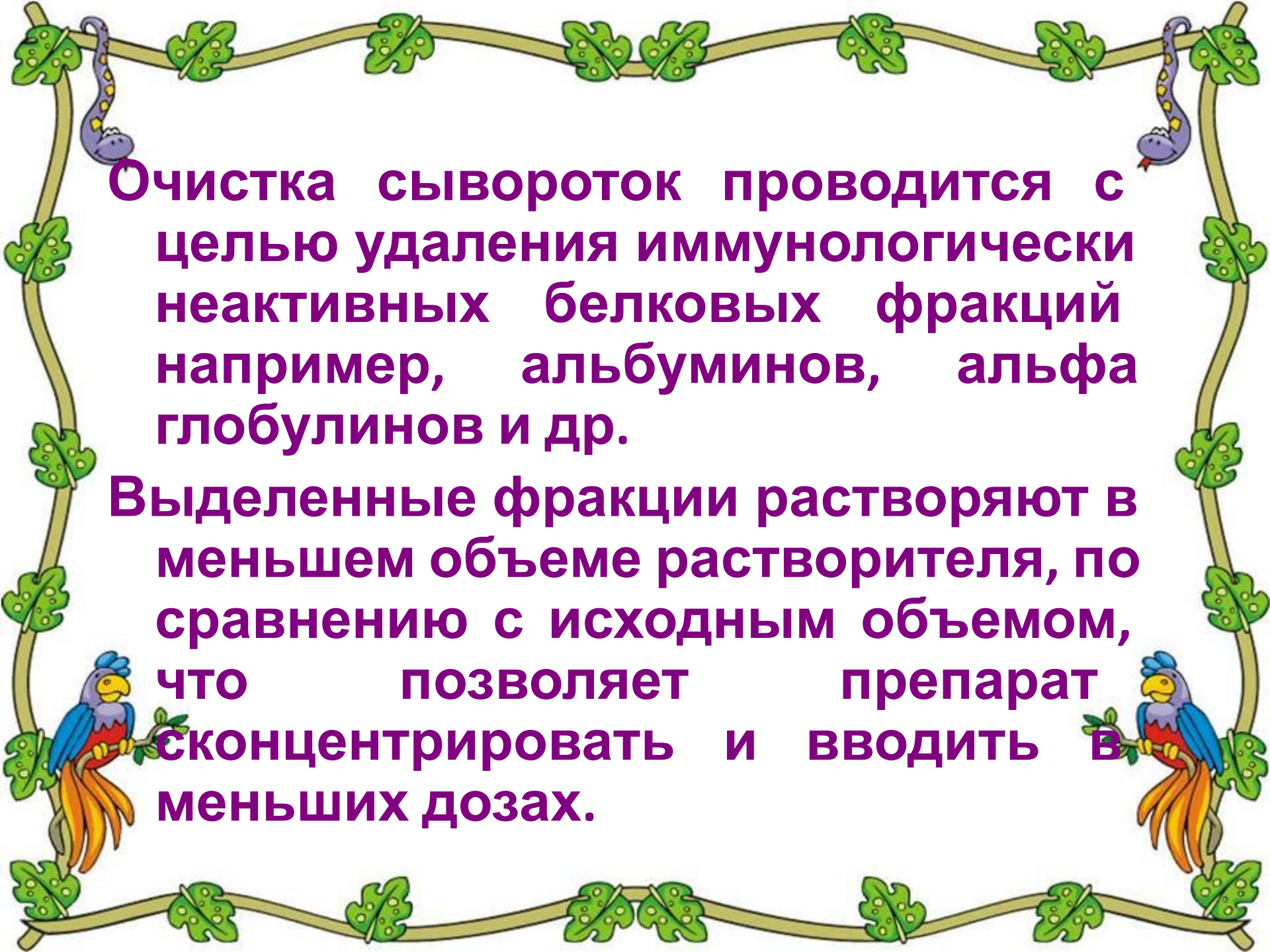
Сыворотку крови консервируют 0,5 % -ным раствором фенола и отстаивают в специальных емкостях в течение двух месяцев. Отстоявшуюся сыворотку фильтруют, а затем стерилизуют.



В последующем сыворотку расфасовывают во флаконах емкостью по 100 мл. Флаконы закрывают пробками и для герметичности их обкатывают алюминиевыми колпачками.

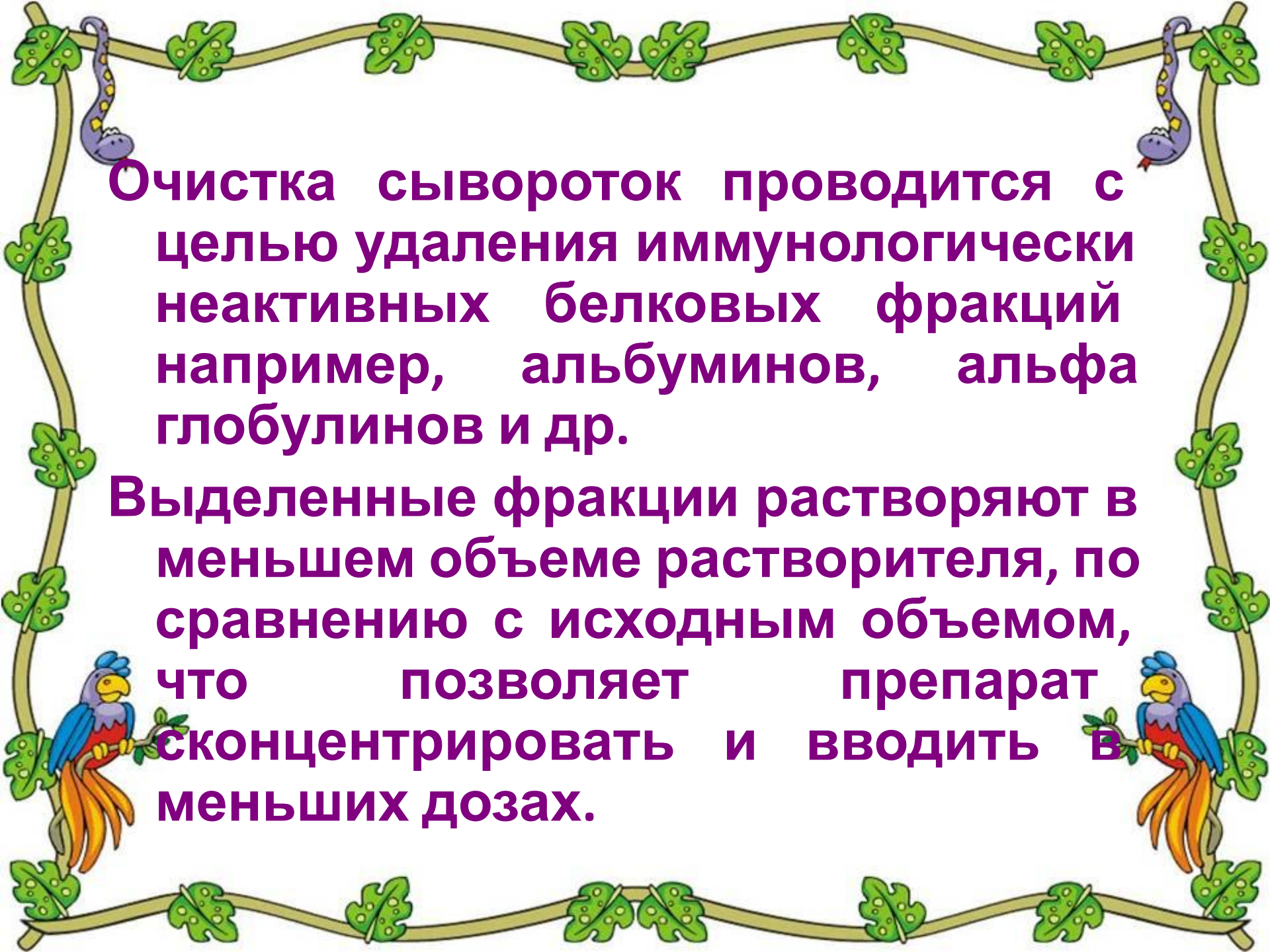
На флаконы наносят этикетку и часть продукции сдают на контроль.

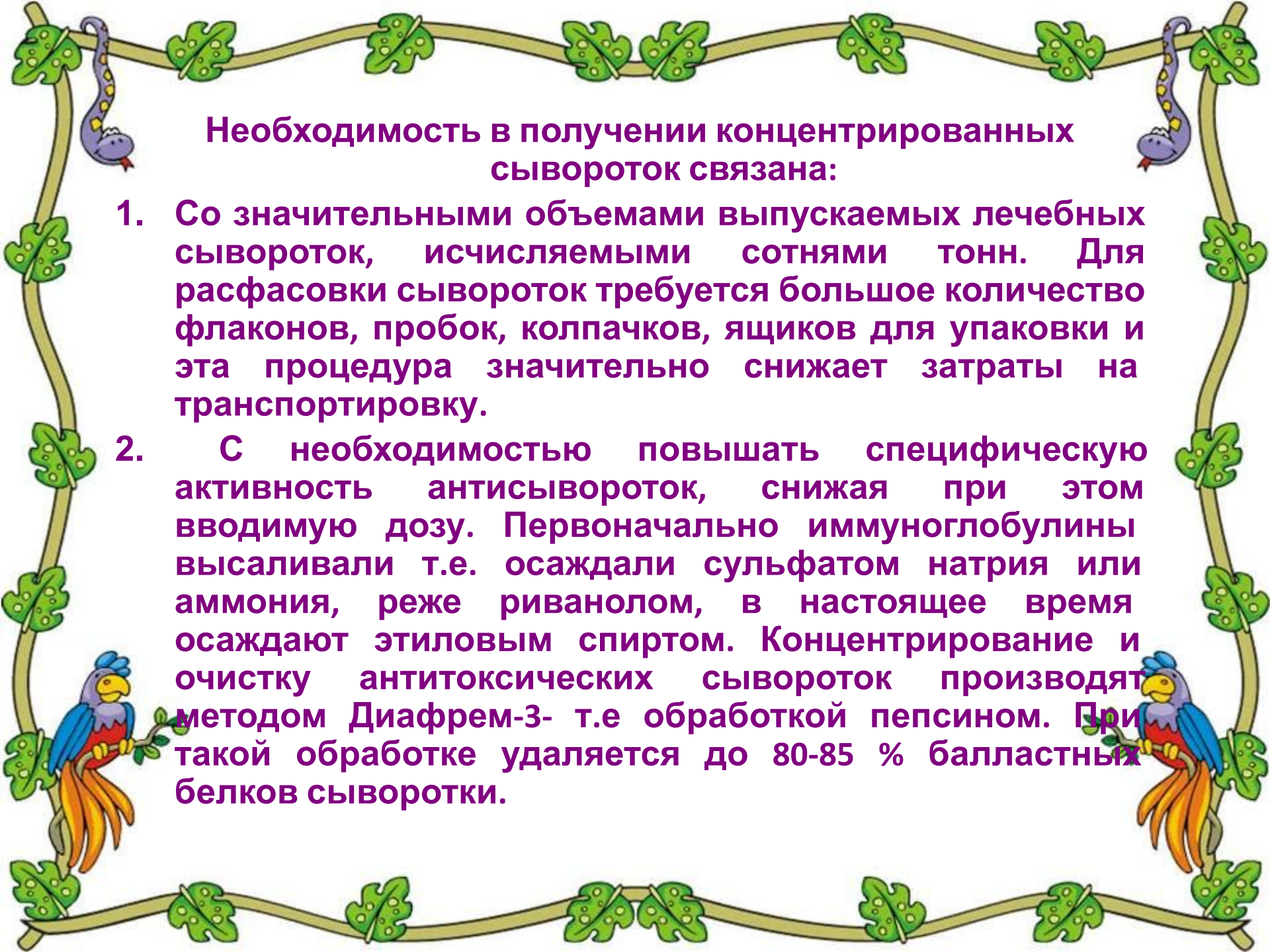
Гипериммунные сыворотки, получаемые из крови путем удаления форменных элементов и фибрина, называются нативными в отличие от сывороток, подвергнутых дополнительной очистке и концентрации специальными методами



Очистка сывороток проводится с целью удаления иммунологически неактивных белковых фракций например, альбуминов, альфа глобулинов и др.

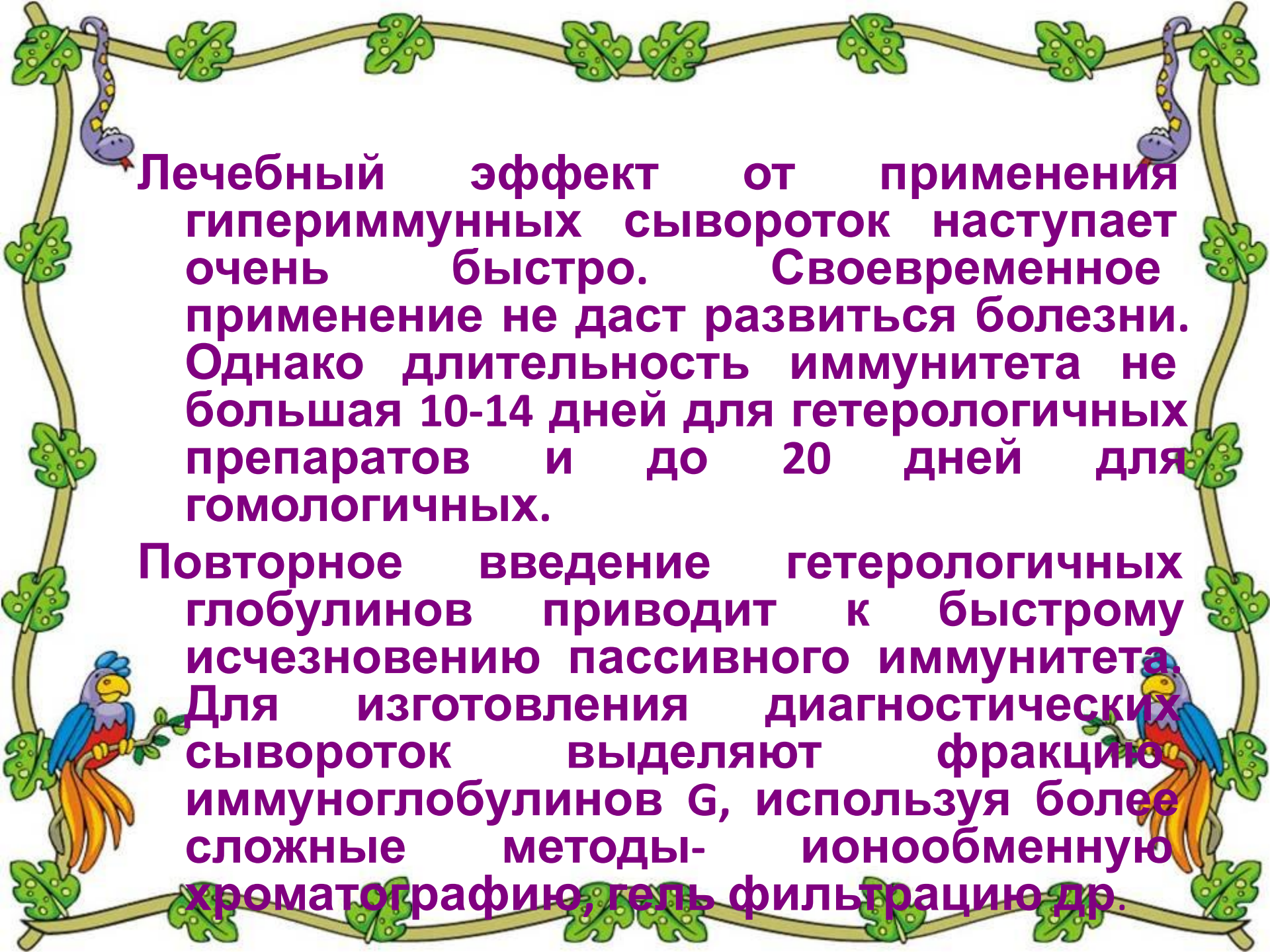
Выделенные фракции растворяют в меньшем объеме растворителя, по сравнению с исходным объемом, что позволяет препарат сконцентрировать и вводить в меньших дозах.





Необходимость в получении концентрированных сывороток связана:

1. Со значительными объемами выпускаемых лечебных сывороток, исчисляемыми сотнями тонн. Для расфасовки сывороток требуется большое количество флаконов, пробок, колпачков, ящиков для упаковки и эта процедура значительно снижает затраты на транспортировку.
2. С необходимостью повышать специфическую активность антисывороток, снижая при этом вводимую дозу. Первоначально иммуноглобулины высаливали т.е. осаждали сульфатом натрия или аммония, реже риванолом, в настоящее время осаждают этиловым спиртом. Концентрирование и очистку антитоксических сывороток производят методом Диафрем-3- т.е. обработкой пепсином. При такой обработке удаляется до 80-85 % балластных белков сыворотки.



Лечебный эффект от применения гипериммунных сывороток наступает очень быстро. Своевременное применение не даст развиваться болезни. Однако длительность иммунитета не большая 10-14 дней для гетерологичных препаратов и до 20 дней для гомологичных.

Повторное введение гетерологичных глобулинов приводит к быстрому исчезновению пассивного иммунитета. Для изготовления диагностических сывороток выделяют фракцию иммуноглобулинов G, используя более сложные методы- ионообменную хроматографию, гель фильтрацию др.

Контроль сывороточных препаратов

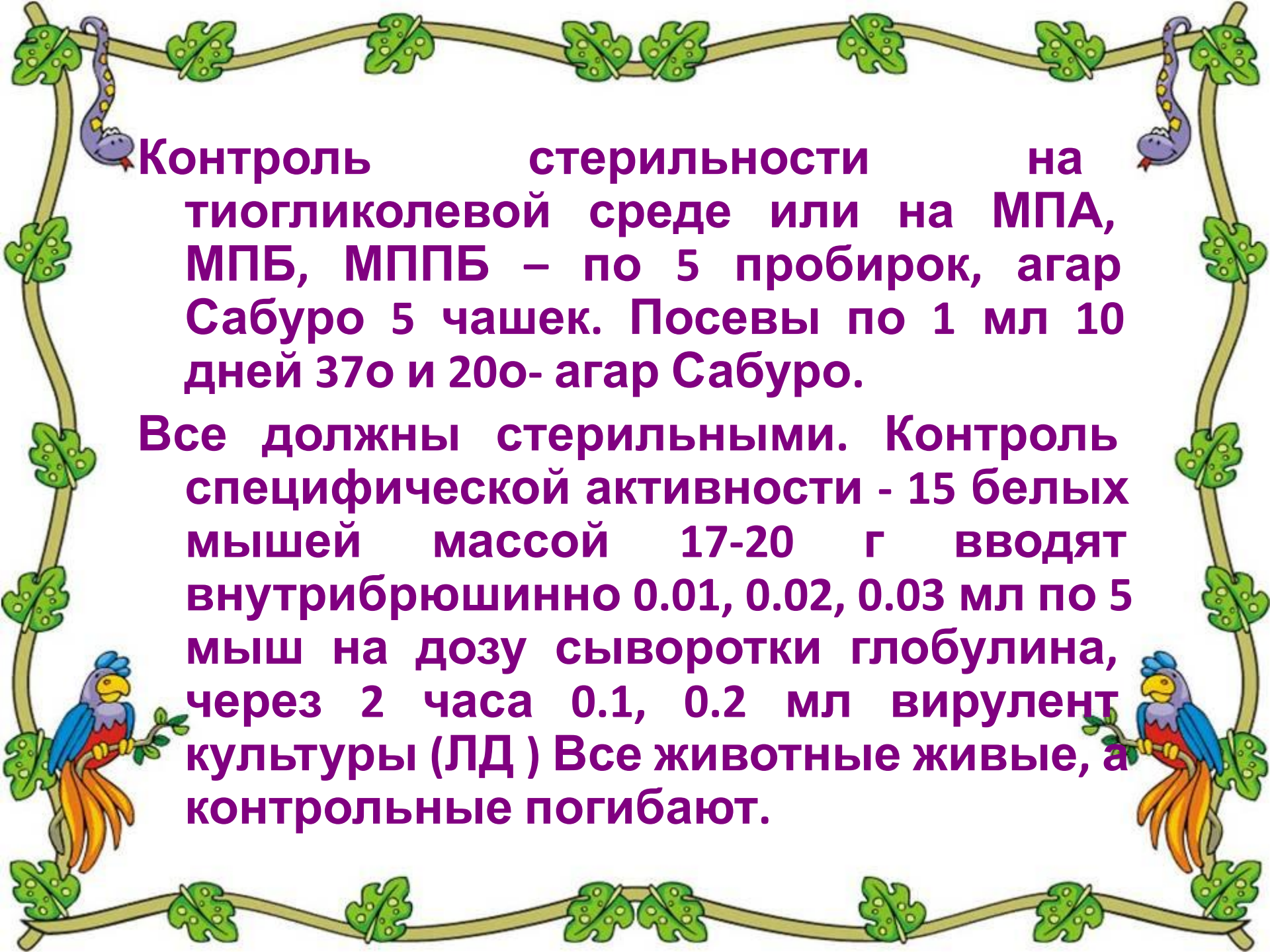
Сывороточные препараты и иммуноглобулины контролируют на:

- безвредность,
- специфическую активность,
- апиrogenность на кроликах или Лал тестом,
- стерильность.

Безвредность контролируют на лабораторных животных.

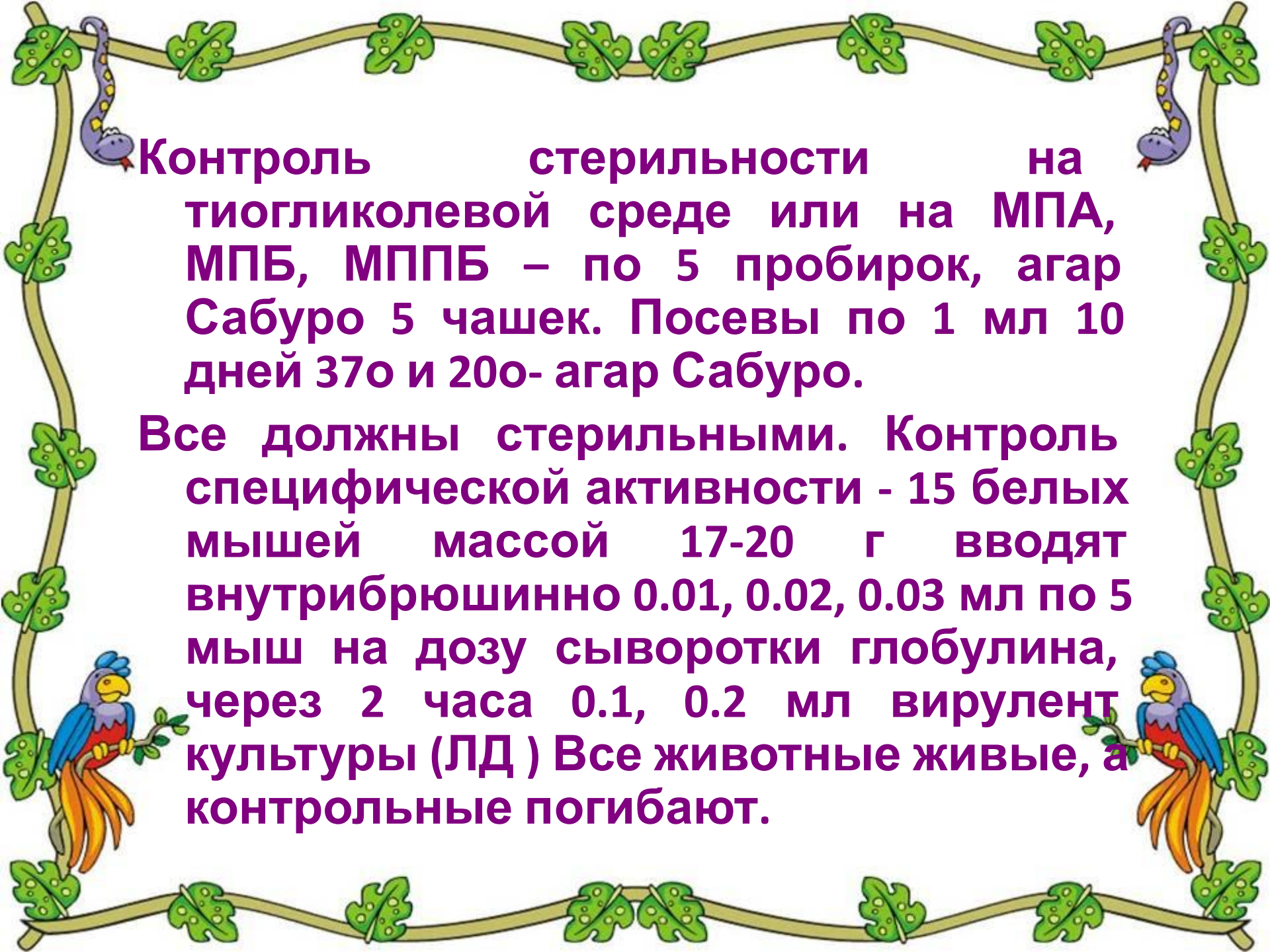
Пример контроля противорожистой сыворотки: 5 белым мышам (п/к 0.5 мл) и 2 морским свинкам масс. 250-300 г. по 10 мл.

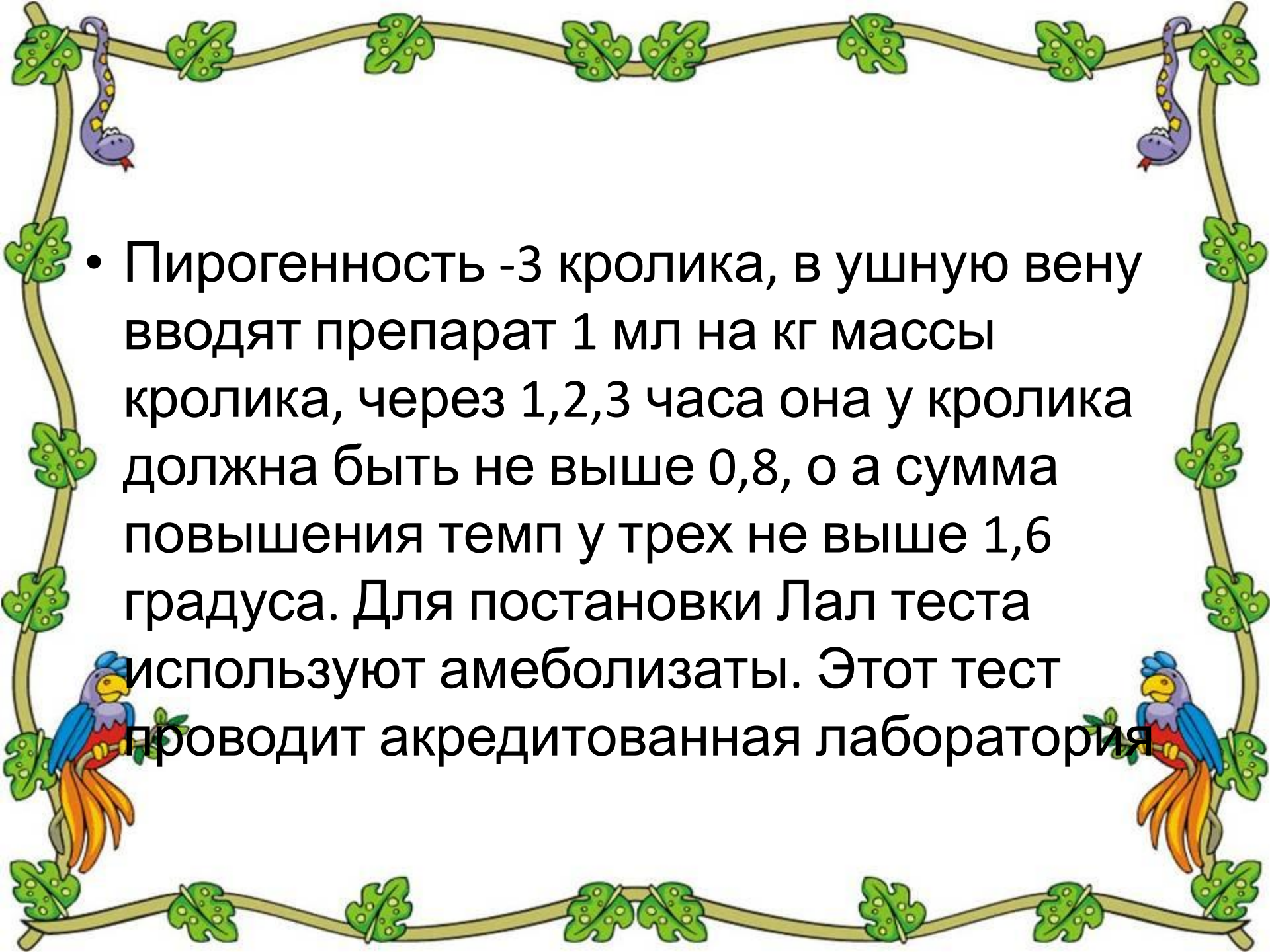
Все должны выжить в течение 10 дней от возбудителя рожи *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

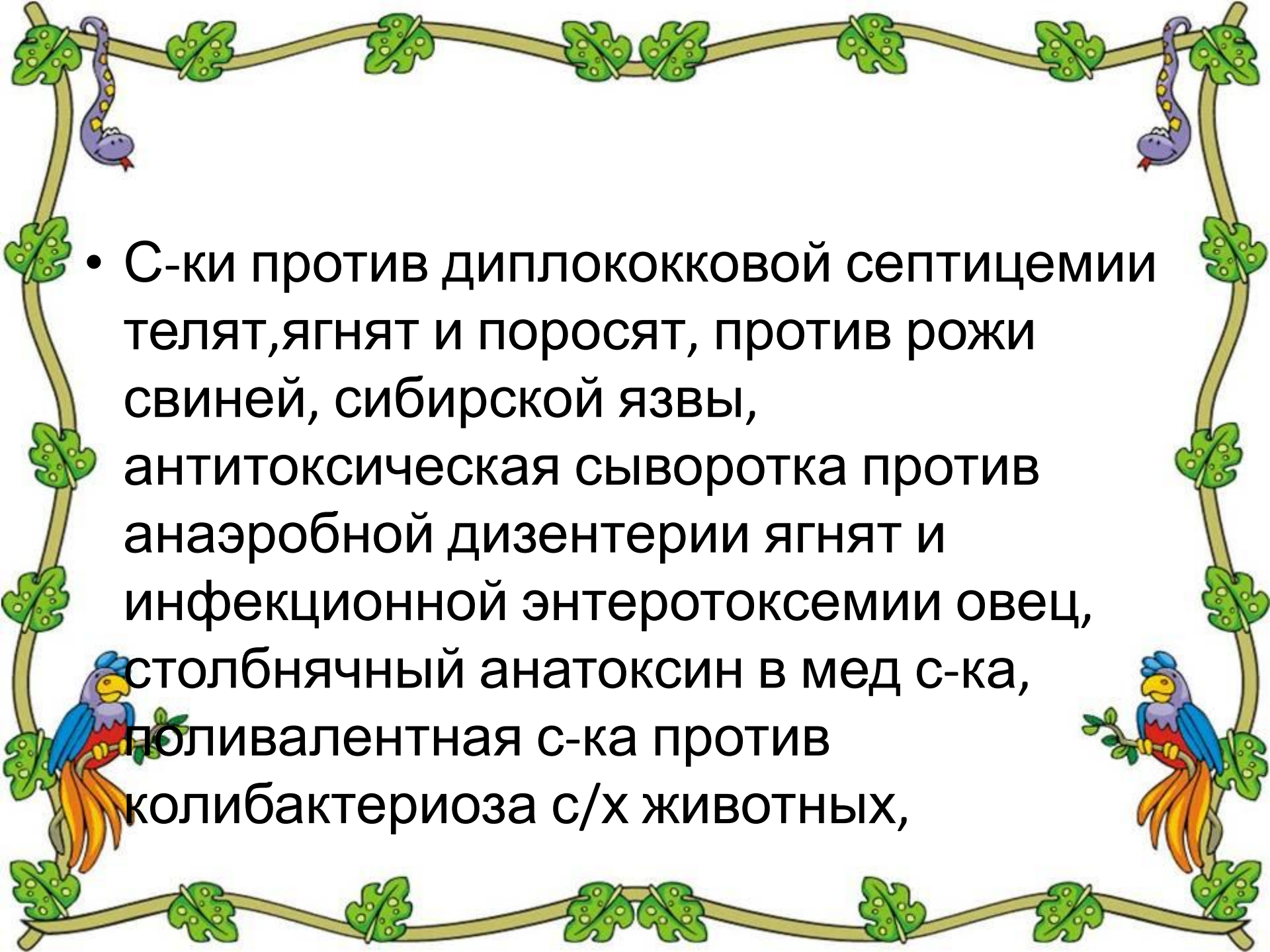


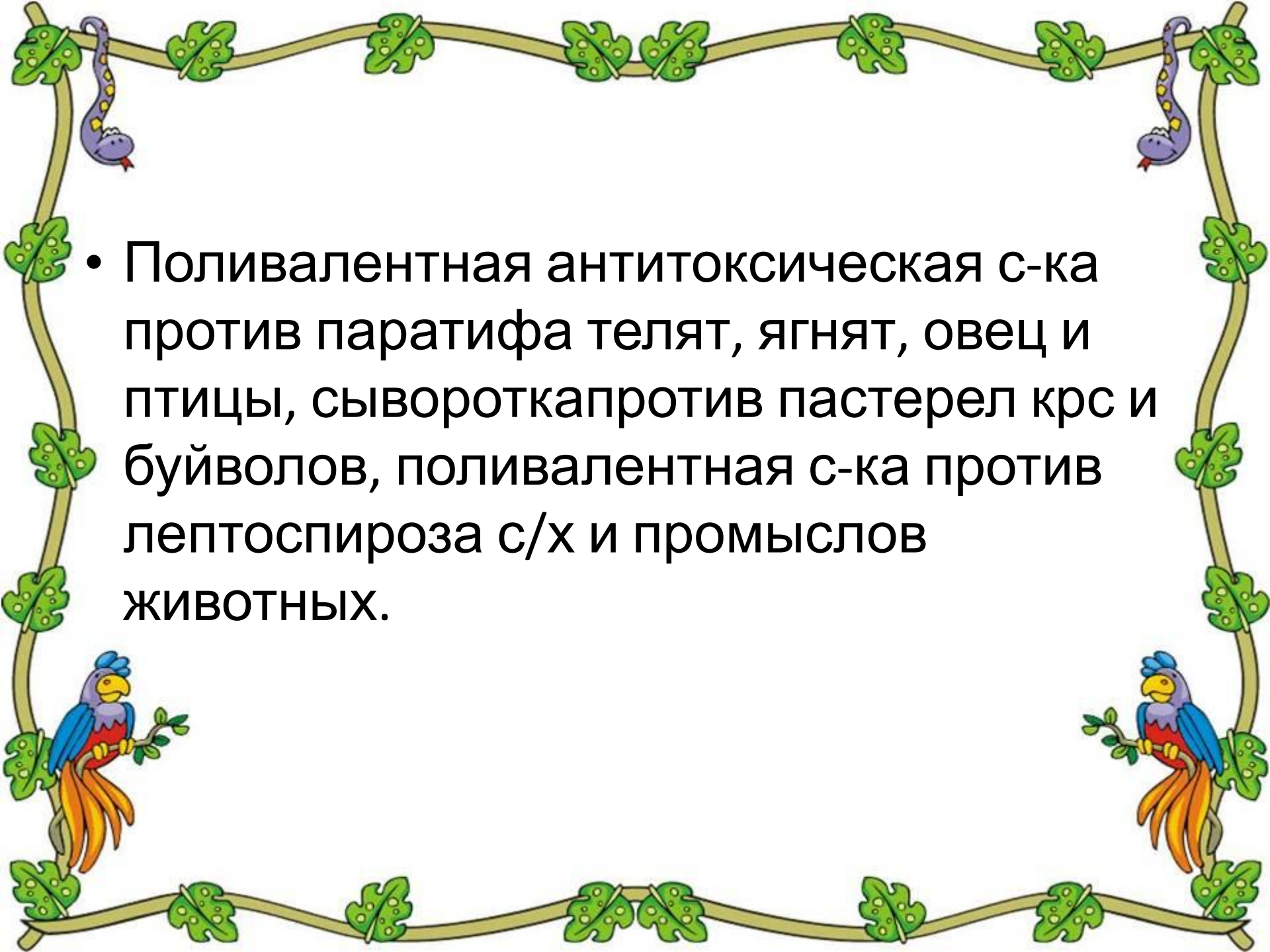
Контроль стерильности на тиогликолевой среде или на МПА, МПБ, МППБ – по 5 пробирок, агар Сабуро 5 чашек. Посевы по 1 мл 10 дней 37° и 20°- агар Сабуро.

Все должны стерильными. Контроль специфической активности - 15 белых мышей массой 17-20 г вводят внутрибрюшинно 0.01, 0.02, 0.03 мл по 5 мыш на дозу сыворотки глобулина, через 2 часа 0.1, 0.2 мл вирулент культуры (ЛД) Все животные живые, а контрольные погибают.



- 
- Пирогенность -3 кролика, в ушную вену вводят препарат 1 мл на кг массы кролика, через 1,2,3 часа она у кролика должна быть не выше 0,8, а сумма повышения темп у трех не выше 1,6 градуса. Для постановки Лал теста используют амеболизаты. Этот тест проводит аккредитованная лаборатория

- 
- С-ки против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят, против рожи свиней, сибирской язвы, антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец, столбнячный анатоксин в мед с-ка, поливалентная с-ка против колибактериоза с/х животных,

- 
- Поливалентная антитоксическая с-ка против паратифа телят, ягнят, овец и птицы, сыворотка против пастерел крс и буйволов, поливалентная с-ка против лептоспироза с/х и промыслов животных.



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!