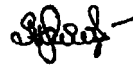


На правах рукописи

УДК 619:616.98:578.831.1:615.371.

Орлов Александр Александрович



РАЗРАБОТКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВИРУСВАКЦИНЫ  
ПРОТИВ НЬОКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Покров-2004

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ)

**Научный руководитель:**

- доктор ветеринарных наук, профессор Лагуткин Николай Алексеевич

**Официальные оппоненты:**

- доктор ветеринарных наук, старший научный сотрудник Кушнир Анатолий Тимофеевич (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, г. Покров);

- кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник Зуев Юрий Владимирович (ФГУ ВГНКИ, г. Москва)

**Ведущая организация:** Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Щелково Московской области).

Защита диссертации состоится 4 июня 2004 г. в 11<sup>30</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу: 601120, г.Покров Владимирской области, ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института.

Автореферат разослан "21" апреля 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук — Савукова Валентина Яковлевна

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

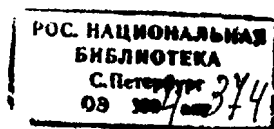
### 1.1. Актуальность темы

Птицеводство является важной отраслью народного хозяйства. Однако наличие особо опасных инфекций, в том числе и ньюкаслской болезни птиц, является сдерживающим фактором роста птицепоголовья. Так, в 1998 году, несмотря на тотальную иммунизацию, в мире было зарегистрировано 2580 опустошительных вспышек ньюкаслской болезни.

Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства РФ запрещено использование обычных эмбрионов для изготовления вакцин, и биологическая промышленность вынуждена приобретать яйца от SPF-кур, стоимость которых, с учётом транспортировки, потерь при инкубации и после заражения, составляет приблизительно 2,5 доллара США за 9 - 10-суточный эмбрион.

Указанное выше, послужило основанием поиска более дешёвой биологической модели - перевиваемых культур клеток, свободных от патогенных микроорганизмов, опасных для птиц, то есть равнозначных SPF-эмбрионам кур. Анализ данных литературы показал, что работы по созданию культуральной вакцины против ньюкаслской болезни птиц за последние 40 лет, как правило, оказывались малоуспешными.

Большое внимание указанной проблеме было уделено Смоленским В.И. (1999) и Руденко Т.В. (2000), которые изучали способность вируса НБ вакцинного штамма "ГАМ-61" к размножению в первичных культурах клеток: куриных, утиных, перепелиных фибробластов, тестикул эмбрионов крупного рогатого скота (ТБ), и в перевиваемых линиях клеток - HeLa, Hep-1, СПЭВ, гонад козы (GA), эндотелия коронарных сосудов сердца. Полученные результаты свидетельствовали о том, что первичные и перевиваемые культуры клеток оказались малочувствительными к данному штамму ВНБ и непригодными для практических целей.



Стрижаченко Н.М. (1964) при разработке экспериментальной культуральной вакцины из штамма "Н" выращивал вирус в перевиваемых культурах клеток человеческого амниона FL (AMH) и сердца обезьяны шимпанзе (СОЦ), а также в первичной культуре клеток почек эмбрионов свиней (СП). Культуральный вариант  $H_{20}$ (AMH) сохранял способность к индукции ВНА и вызывал иммунную защиту птиц по типу интерференции.

Bains B.S. (1979) сообщал об испытании в Австралии тканевой культуральной вакцины против ньюкаслской болезни, но не раскрыл сущность разработки.

Во ВНИИВВиМ также много внимания уделялось этой важной как в научном, так и в практическом плане проблеме Жестеревым В.И. *с соавт.* (1970).

Преимуществами вирусвакцины из культурального варианта штамма ВНБ являются:

- чистота производства (стандарт биохимических принципов изготовления культуральных вакцин); отсутствие технологических средств для утилизации, поскольку в вакцине используется все получаемое вирусное сырьё; экономичность (1,5 — 2 млн. доз можно получить после заражения 100 матрасов с культурой клеток);
- в культуре клеток отсутствуют специфические для куриных эмбрионов контаминанты — вирусы инфекционного энцефаломиелиита и инфекционной анемии цыплят, агенты микоплазмоза и другие;
- культура клеток может служить своеобразным фильтром, избавляющим матровые расплодки ВНБ от случайного загрязнения возбудителями вышеперечисленных заболеваний птиц;
- учитывая финансовые затраты на обычные эмбрионы кур, а тем более на SPF-эмбрионы, вирусвакцина, изготовленная с использованием перевиваемой культуры клеток, будет обходиться в 2 - 3 раза дешевле эмбриональной.

## **1.2. Цель и задачи исследования**

Цель исследований - разработать культуральный вакцинный препарат для профилактики ньюкаслской болезни птиц и изучить его иммунобиологические свойства.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести отбор вакцинного штамма ВНБ и адаптировать его к перевиваемой культуре клеток.
2. Подобрать чувствительную перевиваемую культуру клеток, обеспечивающую высокое накопление инфекционной и антигенной активности данного штамма.
3. Отработать технологические параметры культивирования вируса в пристеночном монослое.
4. Изучить антигенность и иммуногенность лабораторных образцов культуральной вакцины на цыплятах при однократном введении различными методами.
5. Изучить динамику и длительность иммунитета у цыплят, привитых культуральной вирусвакциной.
6. Определить оптимальную иммунизирующую дозу.
7. Изготовить экспериментальный образец культуральной вирусвакцины и изучить его иммунобиологические свойства.

## **1.3. Научная новизна полученных результатов**

1. Определены иммунобиологические и генетические характеристики штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ.

2. Изучены параметры репродукции штамма "М ВНИИВВиМ" вируса ньюкаслской болезни в различных перевиваемых линиях клеток.

3. Изучена динамика накопления титра антигемагглютининов в сыворотке крови цыплят, иммунизированных лабораторными образцами культурального вакцинного препарата.

4. Определена оптимальная иммунизирующая доза для интраназальной вакцинации цыплят против ньюкаслской болезни культуральной вирусвакциной из штамма "М ВНИИВВиМ".

Научная новизна подтверждена решением Федерального института промышленной собственности о выдаче патента на изобретение "Культуральная вирусвакцина против ньюкаслской болезни", отличающуюся тем, что в качестве вируссодержащего материала содержит суспензию мезогенного штамма "М ВНИИВВиМ" вируса ньюкаслской болезни, выращенного на культуре клеток ВНК-21/13.

#### **1.4. Практическая значимость работы**

В результате проведённых исследований разработан и испытан вакцинный препарат на основе культурального вируса НБ, который обеспечивает формирование иммунитета.

Культуральная вирусвакцина позволяет избежать использования для производства SPF-эмбрионов, что снижает трудовые и материальные затраты в 2 - 3 раза.

#### **1.5. Основные положения, выносимые на защиту**

Использование культурального вируса для специфической профилактики ньюкаслской болезни.

Технологические принципы изготовления и контроля культуральной вирусвакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма "М ВНИИВВиМ".

Результаты изучения иммунобиологических свойств культурального вакцинного препарата из штамма "М ВНИИВВиМ".

#### **1.6. Апробация результатов работы**

Материалы диссертации доложены на:

— заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии, 2001-2003 гг.;

- Международной научно-практической конференции "Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов", ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (Покров, 2003 г.).

### **1.7. Публикация результатов**

По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы в материалах научно-практических конференций ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (Покров, 2001 -2003 гг.).

### **1.8. Участие соискателя в получении научных результатов**

Подбор чувствительной культуры клеток проводили совместно с сотрудниками ГНУ ВНИИВВиМ Южук Т.Э. и Чуфаровой Е.В., дифференциацию штаммов вируса ньюкаслской болезни методом рестрикционного анализа продуктов ПЦР проводили совместно с Пантюшенко М.С., выбор защитной среды осуществляли совместно с Гусевой Г.Е., определение иммуногенности осуществляли совместно с Малоголовкиной Н.В. Остальные этапы работы выполнены автором самостоятельно.

### **1.9. Объём и структура диссертации**

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста; включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, список литературы и приложения.

Работа иллюстрирована 13 таблицами, 2 рисунками и дополнена приложениями. Список литературы включает 164 источника, из них зарубежных - 134.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Работа выполнена в 2001 - 2003 гг. в лаборатории "Индикации микроорганизмов" Государственного научного учреждения Всероссийский государственный научно-исследовательский институт ветеринарной микробиологии и

вирусологии Россельхозакадемии в рамках темы № ИФ 17/11 - 2002 от 20.02.2002.

## 2.1. Материалы и методы

### 2.1.1. Материалы

*Вирус ньюкаслской болезни:* вакцинные (мезогенные) штаммы: "Н" и "М ВНИИВВиМ".

*Животные:* эмбрионы кур 9 - 10-суточного возраста; цыплята и цесарята 20 - 30-суточного возраста, не имеющих специфических антител к вирусу НБ или с остаточным уровнем антигемагглютининов 2,0 - 2,5  $\log_2$ .

*Клеточные культуры* вирус культивировали на клетках следующих перерабатываемых линий: тестикул поросёнка (ПТП), почки сибирского горного козорога (ПСГК), почки новорождённого сирийского хомячка (ВНК-21/13) мексиканской сублинии, почки африканской зелёной маргашки (CV-1), фибробластов эмбрионов - кур (SEF). Титрование проводили также на первично-трипсицизированной культуре фибробластов эмбрионов кур.

### 2.1.2. Методы

Вирулентность вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" определяли по:

*Среднему времени гибели 10-суточных куриных эмбрионов:* Среднее время гибели находили путём деления суммы часов гибели всех эмбрионов, вызванной минимальной летальной дозой, на число эмбрионов.

*Интрацеребральному индексу патогенности:* ИЦИП вычисляли путём деления суммы баллов за гибель и проявление клинических признаков болезни на 80 (число наблюдений за 10 цыплятами в течение 8 суток).

*Дифференциация вируса ньюкаслской болезнью методом рестрикционного анализа продуктов ПЦР:* Для определения специфичности ПЦР использовали различные штаммы вируса ньюкаслской болезни, оспы кур, инфекционного ларинготрахеита кур, инфекционной бурсальной болезни, а также интактные куриные эмбрионы. Освобождение РНК от белков осуществляли с помощью фенольно-детергентного метода.



При выборе специфических праймеров для идентификации ВНБ нами были использованы нуклеотидные последовательности, предложенные Грибановым О.Г. с *соавт.* (1999), комплементарные F-гену, фланкирующие вариативный участок, размером 708 и.о. Внутренние праймеры фланкировали ПЦР продукт размером 594 п.о. Синтез кДНК проводили с использованием обратной транскриптазы. Суммарную РНК гибридизировали с праймером и транскрибировали 60 минут при 42 °С.

ПЦР проводили в реакционной смеси объёмом 25 мкл по следующим\* программам: 5 циклов денатурация 94 °С - 60 секунд, отжиг 54 °С - 60 секунд, элонгация 12 °С — 60 секунд; следующие 30 циклов (денатурация, отжиг и элонгация) проводили по 30 секунд соответственно. На основе размеров и расстояний пробегов вычисляли размеры исследуемых фрагментов ДНК (708 и 594 и.о.).

Для дифференциации различных штаммов ВНБ использовали рестрикционный анализ ПЦР продукта размером 708 п.о. (наружные праймеры). С этой целью полученные ПЦР продукты очищали от низкомолекулярных компонентов переосаждением этанолом и расщепляли различными эндонуклеазами рестрикции согласно инструкции фирмы изготовителя и разделяли с помощью электрофореза в 1,5 - 2,0 % агарозном геле. Отбор ферментов рестрикции проводили на основании компьютерного анализа опубликованных нуклеотидных последовательностей F-гена различных штаммов ВНБ птиц.

*Культивирование вируса НБ в культурах клеток:* Клетки инфицировали вирусом (исходный титр вируса штаммов "Н" и "М ВНИИВВиМ" составлял  $8,5 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ ) в дозе 0,001 - 0,01 ПЦД<sub>50</sub>/клетку. Культивирование проводили при  $37,0 \pm 0,5$  °С. Урожай вируса собирали при деструкции 80 - 90 % монослоя или на 7 сутки в слепых пассажах. При детекции специфического ЦПД ёмкости с культурой клеток замораживали, затем оттаивали и полученную вирусосодержащую жидкость использовали для дальнейших пассажей.

*Определение инфекционной активности вируса НБ:* Инфекционную активность вируса определяли титрованием на 9 - 10-суточных куриных эмбрио-

нах - в ЭЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, в первично-трипсинизированной культуре клеток фибробластов эмбрионов кур и в гомологичной перевиваемой культуре клеток - в ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Расчет дозы (разведения) вируса, дающего 50% эффект проводили по методу Рида и Менча, предусматривающему использование кумулятивных данных.

*Лиофилизация:* Для определения оптимальных защитных сред нами был исследован ряд образцов после сублимационного высушивания. Техническую жидкость фасовали по 1 см<sup>3</sup> в стерильные ампулы. Сублимационное высушивание осуществляли на установке камерного типа GT-2 фирмы "Leybold-Heraeus" (ФРГ) при общих требованиях режима высушивания в принятой последовательности.

Контроль над ведением процесса сублимационного высушивания проводили термометрически и посредством измерения электрического сопротивления биоматериала.

Качество высушенных образцов оценивали визуально, по растворимости таблетки и снижению инфекционной и антигенной активности при титровании на КЭ и в РГА.

Контроль стабильности биологической активности лиофилизированных образцов вакцины проводили после прогревания их при температуре  $37,0 \pm 0,5$  °С в течение 7 суток, а некоторых образцов после хранения при 4 °С в течение 1 года.

*Определение антигенности и иммуногенности:* Антигенность и иммуногенность вакцины определяли по уровню и динамике накопления антигемагглютининов в сыворотке крови вакцинированных цыплят и контрольному заражению. Интактных цыплят цесарят 15 - 25-суточного возраста однократно вакцинировали вирусосодержащим культуральным материалом. Препарат вводили интраназально, окулярно, внутримышечно, внутрикожно и аэрозольно. Наличие специфических антител в сыворотках крови определяли в реакции торможения гемагглютинации, постановку которой проводили микрометодом по об-

щепринятой методике. По истечении срока наблюдения проводили контрольное заражение велогенным вирусом НБ штамма "Г-53" в дозе 1000 ЛД<sub>50</sub>/голову внутримышечно.

Эксперименты проводили с числом повторностей ( $\geq 3$ ). Статистическую обработку результатов исследований осуществляли методом наименьших квадратов, принятым в биологии (Лакин Г.Ф., 1990)

## 2.2. Результаты собственных исследований

### 2.2.1. Вирулентность.

Вирулентность штамма "М ВНИИВВиМ" оценивали по индексу патогенности при внутримозговом введении цыплятам (ИЦИП) и определению среднего времени гибели 10-суточных эмбрионов кур, вызванной минимальной летальной дозой (СВГ/МЛД).

Для вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" минимальной летальной дозой оказалось  $10^{-7}$  разведение вируса, так как оно вызвало гибель всех инокулированных эмбрионов. Величина СВГ/МЛД составило  $53,3 \pm 1,7$  ч.

При определении ИЦИП данные о проявлении клинических признаков болезни и гибели цыплят представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения интрацеребрального индекса патогенности

Состояние	Период наблюдения (сутки)								Количество	Баллы	Сумма
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Здоровые	13	13	13	11	5	2	1	1	59	0	0
Больные				2	6	9	7	6	30	1	30
Павшие					2	2	5	6	15	2	30
Итого									104		60

Значение ИЦИП составило 0,58, что свидетельствует о принадлежности штамма "М ВНИИВВиМ" к мезогенной группе ВНБ.

### 2.2.2. Дифференциация вируса Ньюкаслской болезни методом рестрикционного анализа продуктов ПЦР.

ОТ-ПЦР и рестрикционный анализ амплифицированных продуктов осуществляли на базе лаборатории "Биофизики".

Для дифференциации штаммов вируса НБ использовали рестрикционный анализ ПЦР продукта фрагмента генома ВНБ, кодирующего F-протеин. Нами была выбрана система праймеров, предложенных Грибановым О.Г. *с соавт.* (1999), позволяющая проводить амплификацию участка F-гена, включающего сайт разрезания белка F<sub>0</sub> и несколько гипервариабельных областей. Результаты определения специфичности метода ПЦР при исследовании вирусосодержащих образцов различных штаммов вируса НБ с использованием двух пар праймеров свидетельствуют о том, что использованные в работе праймеры специфически амплифицировали фрагмент генома, размер которого соответствуют рассчитанным (708 и 594 п.о.) размерам. Препараты нуклеиновых кислот представителей других вирусов (ДНК вируса оспы кур, ИЛТ кур и РНК вируса болезни Гамборо) и куриных эмбрионов не амплифицировались.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что ПЦР позволяет выявлять нуклеиновые кислоты всех исследованных штаммов ВНБ.

Для дифференциации различных штаммов ВНБ использовали рестрикционный анализ ПЦР продукта размером 708 и.о. (наружные праймеры). С этой целью полученные ПЦР продукты очищали от низкомолекулярных компонентов переосаждением этанолом и расщепляли различными эндонуклеазами рестрикции согласно инструкции фирмы изготовителя. В результате проведенных исследований нами подобраны три рестриктазы MspI, MvaI, BglI, позволяющие разделить исследованные штаммы согласно их биологическим характеристикам (таблица 2).

Таблица 2

Результаты дифференциации различных штаммов ВНБ  
методом рестрикционного анализа продуктов ПЦР

Рестриктазы	Штаммы вируса НБ				
	велогенные		мезогенные		лентогенные
	"ЛП"	"Т-53"	"М ВНИИВ- ВяМ"	"Н"	"LaSota"
MspI	+	+	+	+	-
MvaI	+	+	-	-	-
BglI	-	-	-	-	+

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что метод ПЦР может быть использован для выявления РНК вируса НБ птиц, а рестрикционный анализ амплифицированных продуктов для дифференциации различных штаммов. На основании расщепления амплифицированного фрагмента генома штамма "М ВНИИВВиМ" только рестриктазой *MspI*, он был окончательно отнесен нами к представителям мезогенной группы штаммов ВНБ.

### *2.2.3. Подбор чувствительной клеточной культуры штамма вируса НБ.*

Вирус штамма "М ВНИИВВиМ" культивировали на клетках перевиваемых линий ВНК-21/13, ПТП, CV-1, СЕФ, ПСПС. Вирус штамма "Н" - ВНК-21/13, ПТП и ПСПС. Цитопатическое действие вируса штамма "М ВНИИВВиМ" в различных перевиваемых культурах клеток было неодинаковым. Так, в культурах ВНК-21/13, CV-1 и ПТП цитопатическое действие (ЦПД) проявлялось набуханием с последующим округлением клеток, вплоть до полного разрушения монослоя и образования равномерной взвеси одиночных клеток, а в перевиваемой культуре клеток СЕФ ведущим признаком проявления ЦПД являлось формирование клеточных конгломератов с образованием синцития. В культуре ПСПС заметных изменений при культивировании вируса штамма "М ВНИИВВиМ" выявить не удалось. В клетках ВНК-21/13, CV-1 и ПТП цитопатическое действие проявлялось в более короткие сроки (48 часов), чем на СЕФ, где ЦПД носило затяжной характер (72 - 96 часов).

При репродукции вируса НБ штамма "Н" в культурах ВНК-21/13, ПТП и ПСПС уже через 24 часа отмечали округление клеток, вакуолизацию цитоплазмы, а спустя 2 суток — полное разрушение монослоя.

Биологическую активность вирусных материалов различных пассажей определяли титрованием на развивающихся куриных эмбрионах, в первично-трипсинизированной культуре фибробластов эмбрионов кур и в гомологичной культуре клеток.

Данные о биологической активности вируса НБ штаммов "М ВНИИВ-ВиМ" и "Н" после культивирования на различных перевиваемых культурах клеток представлены в таблице 3.

Таблица 3

Биологическая активность вируса НБ штаммов "М ВНИИВВиМ" и "Н" при культивировании в перевиваемых культурах клеток

n=3

Штамм НБ	Культура клеток	№ пассажа	Гемагглютинирующая активность (log <sub>2</sub> )	ЭЛД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup>	ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> (ФЭК)	ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> (гомологичная культура)
М ВНИИВВиМ	ВНК-21/13	5	5 – 6	7,59±0,18	7,25±0,08	7,43±0,26
		10	5 – 6	7,33±0,03	7,67±0,15	7,38±0,14
	ПТП	5	5 – 6	6,75±0,09	7,43±0,36	6,87±0,34
		10	5 – 6	7,06±0,10	7,82±0,02	7,13±0,85
	CV-1	5	4 – 5	7,39±0,10	7,36±0,14	6,14±0,25
		10	4 – 5	6,60±0,20	7,38±0,09	6,35±0,67
	CEF	5	3 – 4	6,40±0,27	6,78±0,04	5,05±0,29
		10	3 – 4	6,34±0,01	6,86±0,12	4,87±0,17
ПСГК	5	0	—	—	—	
Н	ВНК-21/13	5	4 – 5	6,11±0,19	6,17±0,18	7,02±0,27
		5	4 – 5	6,69±0,13	6,20±0,39	6,87±0,44
	ПСГК	5	3 – 4	6,98±0,21	5,43±0,30	6,56±0,56

При сравнении биологической активности нами выявлена более высокая гемагглютинирующая активность культуральных вариантов 10 пассажа вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" на культурах ВНК-21/13 и ПТП, которая на 1 - 2 log<sub>2</sub> выше, нежели у культуральных вариантов штамма "Н" вируса НБ. Инфекционная активность культурального вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ", полученного на ВНК-21/13 была выше на 1,48 lg ЭЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, чем у вируса НБ штамма "Н" размноженного на данной культуре. Инфекционная активность для ФЭК культуральных вариантов вируса штамма "М ВНИИВВиМ", полученных на ВНК-21/13 и ПТП, была на 1,05 - 1,65 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> выше, чем у культуральных вариантов вируса штамма "Н".

2.2.4. *Определение оптимальной множественности заражения культур клеток*

Проведённые исследования показали, что множественность заражения определяет время проявления ЦПД и титр инфекционной активности вируса. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Определение оптимальной множественности заражения

Культура клеток	Множественность заражения (ТЦД <sub>50</sub> /клетку)	Время проявления ЦПД (час)	Инфекционный титр (lg ЭЛД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
ВНК-21/13	1,0	40 – 48	6,98±0,08
	0,1	48	7,04±0,10
	0,01	48	7,21±0,16
	0,001	48 – 60	6,98±0,36
	0,0001	72	6,87±0,14
ПТП	1,0	40 – 48	6,54±0,13
	0,1	48	7,26±0,08
	0,01	48	7,47±0,08
	0,001	48 – 60	7,09±0,03
	0,0001	72	6,76±0,12

Из приведенных данных видно, что оптимальная множественность заражения клеток ВНК-21/13 штаммом "М ВНИИВВиМ" ВНБ составила 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку, при которой через двое суток после культивирования получали вирусосодержащий материал с инфекционной активностью 7,21±0,16 lg ЭЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Оптимальная множественность заражения, клеток ПТП вирусом НБ штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ также составила 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку, которая через 48 часов культивирования обеспечила получение вирусосодержащего материала с инфекционной активностью 7,47±0,08 lg ЭЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

2.2.5. *Роллерное и стационарное культивирование.*

При роллерном и стационарном культивировании ЦПД, вызываемое репродукцией штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ, характеризовалось округлением клеток, вакуолизацией цитоплазмы, с последующим полным разрушением монулоя в течение 48 часов. Активность полученных материалов представлена в таблице 5.

Биологическая активность штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ  
при культивировании стационарным и роллерным методами

n=3

Культура клеток	Метод культивирования	Инфекционная активность (lg)				Гемагглютинирующая активность
		на КЭ	на ФЭК	на ПТП	на ВНК-21/1	
ПТП	стационарный	7,11±0,19	8,59±0,15	7,44±0,10	—	1/32 – 1/64
	роллерный	7,06±0,34	8,30±0,11	7,67±0,16	—	1/32 – 1/64
ВНК-21/13	стационарный	7,33±0,03	7,68±0,47	—	7,24±0,86	1/32 – 1/64
	роллерный	7,34±0,17	7,67±0,16	—	7,39±0,10	1/32 – 1/64

При сравнении результатов культивирования вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" на культурах ВНК-21/13 и 11111 стационарным и роллерным методами нами не выявлено существенных различий по инфекционной и гемагглютинирующей активности полученных материалов. Однако при культивировании вируса в круговом монослое ЦПД проявлялось на 24 часа раньше (через 48 часов), чем при культивировании стационарным способом (через 72 часа).

#### 2.2.6. Выбор защитной среды для сублимационного высушивания

Сублимационное высушивание экспериментальных образцов проводили на базе лаборатории "Конструирования биопрепаратов".

В качестве защитных сред были использованы комплексные стабилизаторы:

состоящий из ГЛА - 2%, сахарозы - 6%, желатозы - 1 % ;

состоящий из пептона - 10%, сорбита — 2%, желатозы — 1%;

состоящий из пептона - 10%, лактозы - 2%, желатозы - 1%;

состоящий из пептона - 10%, сахарозы - 5%, желатозы - 1%;

состоящий из пептона - 10%, сахарозы — 10%, желатозы — 1%.

Начальные концентрации рассчитывались по пропорции смешивания, которая составляла для защитной среды, содержащей ГЛА, 10% от общего объёма технической жидкости, а для всех остальных - 25%.

Результаты визуальной оценки и физические параметры высушенных образцов представлены в таблице 6.



Влияние состава защитных сред на качество вакцины

№ п/п	Состав защитной среды* (конечная концентрация по массе), %	Эвтектика, минус °С		Растворимость, мин	Макровид	Массовая доля влаги, %
		T <sub>эвт</sub> <sup>И</sup>	T <sub>эвт</sub> <sup>В</sup>			
1	ГЛА – 2%, сахара – 6%	38	36	Менее 1	Стандарт	3,8
2	Пептон – 10%, сорбит – 2%	38	35	Менее 1	Стандарт	2,1
3	Пептон – 10%, лактоза – 2%	37	33	Менее 1	Стандарт	2,4
4	Пептон – 10%, сахара – 5%	38	35	Менее 1	Неоднородность	3,7
5	Пептон – 10%, сахара – 10%	38	36	Менее 1	Частичное расслоение	4,2

Примечание: \* - В состав всех защитных сред входит желатоза в 1 % концентрации.

Потери инфекционной активности лиофильно высушенных препаратов представлены в таблице 7.

Установлено, что для сублимационного высушивания культурального вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" лучшим оказался стабилизатор; в состав которого входит пептон, лактоза и желатоза. Снижение исходного титра вируса при его использовании не превышало  $0,25 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ , а после теста "ускоренного старения" титр снизился на  $0,75 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ . Аналогичные результаты получены при использовании в качестве защитной среды, состоящей из пептона, сорбита и желатозы - после лиофилизации титр снизился на  $0,38 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ , однако после термоинактивации при температуре  $37,0 \pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$  в течение 7 суток титр препарата оказался наиболее высоким из всех исследуемых образцов, так как снизился только на  $0,57 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$  и составил  $6,43 \pm 0,15 \lg \text{ЭЛД}_{50}/\text{см}^3$ .

Влияние состава защитных сред на инфекционную активность лиофилизированного материала

n=3

Состав защитной среды* (конечная концентрация по массе), %	Инфекционная активность технической жидкости*	Инфекционная активность лиофилизованного материала	$\Delta$ Инфекционной активности	Инфекционная активность после "ускоренного старения"	$\Delta$ Инфекционной активности	Инфекционная активность после хранения при +4 °С	$\Delta$ Инфекционной активности
ГЛА - 2%, сахароза - 6%	7,45±0,00	7,11±0,20	0,34	5,17±0,27	1,94	---	---
Пептон - 10% сорбит - 2%	7,38±0,00	7,00±0,17	0,38	6,43±0,15	0,57	6,92±0,14	0,08
Пептон - 10%, лактоза - 2%	7,38±0,00	7,13±0,12	0,25	6,38±0,01	0,75	6,92±0,14	0,21
Пептон - 10%, сахароза - 5%	7,38±0,00	6,59±0,12	0,79	5,60±0,16	0,99	---	---
Пептон - 10%, сахароза - 10%	7,38±0,00	6,83±0,17	0,55	5,33±0,13	1,5	---	---

Примечание: \* Исходная инфекционная активность вирусодержащего материала составила 7,5 lg ЭЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

\*\*В состав всех защитных сред входит желатоза в конечной концентрации - 1%.

При хранении лиофилизированных препаратов с использованием в качестве защитных сред комплексных стабилизаторов на основе пептона и лактозы или сорбита при 4 - 6 °С в течение года снижение инфекционной активности составило не более 0,21 lg ЭД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Антигенная активность всех образцов культурального вируса НБ штамма "М ВНИИВВиМ" после сублимационного высушивания, теста "ускоренного старения" и длительного хранения не изменилась и составила 5 - 6 log<sub>2</sub> при титровании в РГА.

#### *2.2.7. Определение иммуногенности культуральных вариантов*

Для определения иммуногенности вирусных вариантов, полученных при культивировании на перевиваемых линиях клеток ВНК-21/13 и ПТП, были вакцинированы однократно интактные цыплята 20 - 25-суточного возраста. Вирусные материалы, полученные на культурах ПТП, применяли интраназально, внутримышечно, аэрозольно, окулярно и внутрикожно, а вариант, полученный на ВНК-21/13 - интраназально, внутримышечно, аэрозольно и внутрикожно. С целью изучения возможности распространения вируса в стаде при иммунизации к группе цыплят, вакцинированных интраназально, были подсажены не вакцинированные цыплята. При интраназальном, внутримышечном окулярном и внутрикожном методах вакцинации вводили 100 - 200 тысяч ЭД<sub>50</sub>/гол, при аэрозольной вакцинации рабочее разведение определяли из расчета 600 ЭД<sub>50</sub>/гол. С целью изучения динамики иммунного ответа у птиц отбирали кровь до и после вакцинации на 7, 14, 21 и 28 сутки. Исключение составила группа цыплят вакцинированных интраокулярно, у которых кровь отбирали до и после вакцинации на 7 и 14 сутки. У привитой птицы за весь период наблюдения не отмечали случаев недомогания, снижения аппетита, одышки и падежа. При внутрикожной иммунизации с 3 по 7 сутки на месте введения вакцинного материала отмечали гиперемию и небольшой отёк. В дальнейшем признаки воспалительной реакции отмечены не были.

Иммуногенная активность вирусосодержащих материалов, полученных при культивировании штамма "М ВНИИВВиМ" на ВНК-21/13 и ПТП

n=3

Материал	Метод вакцинации	Кол-во голов	Титр антигемагглютининов ( $\log_2$ ) по суткам			
			7	14	21	28
ПТП	назально	30	4,0±0,1	7,9±1,2	9,0±1,2	7,8±1,4
	в/м	10	7,6±0,3	9,3±0,7	9,1±0,5	9,8±0,8
	аэрозольно	10	3,2±0,2	8,6±0,4	9,0±0,6	9,6±0,7
	окулярно	20	1,1±0,1	7,3±1,0	9,3±1,2	---
	внутрикожно	10	---	8,6±0,7	9,0±0,9	---
ВНК-21/13	назально	15	3,8±0,9	7,3±0,6	9,0±0,7	8,0±0,8
	в/м	10	5,4±0,4	7,1±0,4	8,3±0,3	7,7±0,4
	аэрозольно	10	2,7±0,1	8,3±0,4	8,7±0,2	9,2±0,8
	внутрикожно	10	7,4±0,6	10,2±0,9	10,7±1,0	9,4±0,4
	контакт	5	0	0	0	0
Контроль		16	0	0	0	0

Защитный титр антигемагглютининов во всех группах вакцинированных цыплят отмечали на 14 сутки. Он составлял 7 - 10  $\log_2$ . Максимальный титр антител в группах, иммунизированных интраназально вакцинным материалом, полученном как на ВНК-21/13 так и на ПТП, отмечали на 21 сутки после вакцинации (9,0  $\log_2$ ). Также на 21 сутки был отмечен максимальный уровень антигемагглютининов в группе цыплят, вакцинированных внутрикожно, он составил 10,7  $\log_2$  у материала, полученного на ВНК-21/13 и 9,0  $\log_2$  у материала, полученного на ПТП. В группах цыплят, вакцинированных и аэрозольно, максимальный титр антител отмечали на 28 сутки после иммунизации (9,2 и 9,6  $\log_2$ ). В группах цыплят, вакцинированных внутримышечно, отмечали некоторый разброс по времени достижения максимальных титров антигемагглютининов. Так при введении материала, полученного на ВНК-21/13, он приходился на 21 сутки после иммунизации (8,3  $\log_2$ ), а при введении материала, полученного на ПТП - на 28 сутки (9,8  $\log_2$ ). В сыворотках цыплят, находившихся в контакте с вакцинированным поголовьем, антигемагглютининов к ВНБ в сыворотке крови не было обнаружено в течение всего периода наблюдения.

Изучение длительности иммунитета показало, что антитела, выявляемые в РТГА, обнаруживали в пробах сывороток крови цыплят через 3 месяца после

однократной вакцинации интраназальным методом в титре  $6,6 \pm 0,3 \log_2$  при инокуляции материала, полученного культуре на ПТП, и  $6,7 \pm 0,6 \log_2$  - материала, полученного на культуре ВНК21/13. При однократном внутримышечном и аэрозольном введении культурального вируса НБ, выращенного на ВНК-21/13, титр антигемагглютининов в сыворотках составил  $7,5 \pm 0,3 \log_2$  и  $8,5 \pm 0,6 \log_2$ , соответственно.

После контрольного заражения во всех группах иммунизированных цыплят падежа отмечено не было. Контрольные цыплята и цыплята, находившиеся в контакте с вакцинированным поголовьем, пали с характерными признаками ньюкаслской болезни, что было подтверждено данными патологоанатомического вскрытия.

#### *2.2.8. Определение иммунизирующей дозы*

Для определения иммунизирующей дозы четыре группы 20-суточных интактных цыплят были интраназально вакцинированы десятикратными разведениями вакцинного материала с инфекционной активностью  $7,0 \lg \text{ЭД}_{50}/\text{см}^3$ . Этим же материалом иммунизировали внутримышечно в дозе  $5000 \text{ЭД}_{50}/\text{гол}$ . У птиц отбирали кровь после вакцинации на 7 и 14 сутки и исследовали пробы сыворотки в РТГА для определения титра антигемагглютининов. Титры антител к ВНБ представлены в таблице 8.

В течение всего периода наблюдения признаков педомогания и падежа вакцинированной птицы отмечено не было.

Через 7 суток после иммунизации в сыворотках крови вакцинированных цыплят были обнаружены следы антигемагглютининов. Однако, через 14 суток уровень антител к ВНБ в группах цыплят, иммунизированных интраназально в дозах  $10000$  и  $100000 \text{ЭД}_{50}/\text{гол}$  и внутримышечно, выявили как защитный ( $5,8 \pm 0,7$ ;  $7,7 \pm 0,5$  и  $5,6 \pm 0,8 \log_2$  соответственно). В группе цыплят, привитых в дозе  $1000 \text{ЭД}_{50}/\text{гол}$  интраназально, уровень антигемагглютининов был крайне низок ( $1,3 \pm 0,2 \log_2$ ), а в сыворотке крови цыплят, иммунизированных дозой  $100 \text{ЭД}_{50}/\text{гол}$  интраназально - они отсутствовали.

Через 14 суток после вакцинации для определения иммуногенности было проведено контрольное заражение цыплят вирулентным штаммом ВНБ. Результаты контрольного заражения показали, что иммунизирующие дозы 10000 - 100000 ЭЛД<sub>50</sub>/гол интраназально и 5000 ЭЛД<sub>50</sub>/гол внутримышечно обеспечивают 90 - 100 % защиту цыплят от везикулярного ВНБ. Иммунизирующая доза 100 ЭЛД<sub>50</sub>/гол интраназально не обеспечивает защиты от контрольного заражения. При введении цыплятам 1000 ЭЛД<sub>50</sub>/гол культурального вируса ВБ штамма "М ВНИИВВиМ" интраназально уровень защиты составил 20%. Контрольные цыплята пали все.

Расчетным путём установлено, что при интраназальном методе вакцинации ИД<sub>50</sub> составила 3,37 lg ЭЛД<sub>50</sub>/гол, ИД<sub>90</sub> - 4,0 lg ЭЛД<sub>50</sub>/гол. Иммунизирующая доза, равная 5000 ЭЛД<sub>50</sub>/гол при внутримышечном введении обеспечивает, 100% защиту вакцинированных цыплят.

#### *2.2.9. Определение чувствительности цесарок к вирусу ньюкаслской болезни*

По данным литературных источников ВНБ может поражать не только цыплят, но и цесарок. В наших исследованиях мы подтвердили возможность заражения и гибели интактных цесарят 25 - 30-суточного возраста эпизоотическим штаммом "Т-53" в дозе 100 ЛД<sub>50</sub> при интраназальном методе введения. Клинические признаки заболевания ВБ проявились на 4 сутки после заражения и сопровождались угнетением, потерей координации движения, отказом от воды и пищи. На 6 - 8 сутки отмечали гибель заражённых птиц. Смертность составила 100%. При патологоанатомическом вскрытии отмечено катаральное воспаление слизистой оболочки гортани и трахеи, воспаление железистого желудка, незначительное увеличение селезёнки, в кишечнике — острое катаральное воспаление, гиперемия, точечные кровоизлияния. В головном мозге наблюдали отёк мозговой ткани и гиперемия сосудов. Из органов павших птиц было проведено выделение вируса на 9-суточных куриных эмбрионах и его титрование в РТГА.

С целью оценки иммуногенной активности культурального варианта штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ нами была интраназально привита группа цесарят из 10 голов вирусом, полученном на перевиваемой линии клеток ПТП, в дозе 150000 ЭД<sub>50</sub>/гол. Антигенную и иммуногенную активность культурального вакцинного ВНБ определяли через 14 суток после вакцинации исследованием проб крови на наличие антигемагглютининов и путём контрольного заражения.-

Титр антител в РТГА составил  $5,63 \pm 0,16 \log_2$ , что указывает на активную выработку антигемагглютининов при интраназальной вакцинации цесарят против ньюкаслской болезни. При контрольном заражении вся привитая птица выжила.

### 3. ВЫВОДЫ

1. Разработана вирусвакцина против ньюкаслской болезни птиц из штамма "М ВНИИВВиМ" культуральная сухая.

2. Штамм "М ВНИИВВиМ" ВНБ по степени вирулентности - интрацеребральному индексу патогенности, равному - 0,58 и результатам рестрикционного анализа продуктов ПЦР (расщепление только нуклеазой MspI) является представителем мезогенной группы.

3. Лучшей биологической системой для лабораторного и промышленного культивирования штамма "М ВНИИВВиМ" ВНБ являются перевиваемые линии клеток ВНК-21/13 и 11111. При инфицировании культур в дозе 0,001 - 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/клетку и инкубировании в течение 48 — 72 часов при температуре  $37 \pm 0,5$  °С стационарным и роллерным методами, получали вакцинный материал с титром 5 - 6  $\log_2$  в РГА, 7,06 - 7,34 lg ЭД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> при титровании на КЭ и 7,67 - 8,59 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> при титровании на ФЭК.

4. Вирусвакцина против ньюкаслской болезни из штамма "М ВНИИВВиМ" культуральная сухая безвредна для интактных цыплят 20 - 30-суточного - возраста при аэрозольном применении в дозе 600 ЭД<sub>50</sub>/гол, интрапазальном, окулярном, внутримышечном - в дозе 100000 - 150000 ЭД<sub>50</sub>/гол и внутрикожном - в дозе 150000 - 200000 ЭД<sub>50</sub>/гол методами введения, а также для це-

сарят 20-суточного возраста при интраназальной вакцинации в дозе 150000 ЭЛД<sub>50</sub>/гол и индуцирует образование у привитых птиц антител, выявляемых в РТГА, в титре 4 log<sub>2</sub> и выше.

5. Вирусвакцина против ньюкаслской болезни птиц из штамма "М ВНИИВВиМ" культуральная сухая через 14 суток после однократной прививки интраназальным, внутримышечным и аэрозольным методами обеспечивает 100% защиту вакцинированного поголовья продолжительностью не менее трёх месяцев.

6. Оптимальная иммунизирующая доза для интраназального метода вакцинации составляет 5,00 lg ЭЛД<sub>50</sub>/гол; ИД<sub>90</sub> равна 3,97 lg ЭЛД<sub>50</sub>/гол; ИД<sub>50</sub> — 3,43 lg ЭЛД<sub>50</sub>/гол.

7. Оптимальными защитными средами для сублимационного высушивания являются комплексные стабилизаторы: пептон — 10%, лактоза — 2%, желатоза - 1% и пептон - 10%, сорбит - 2%, желатоза — 1%, внесённые в техническую жидкость в пропорции 25% стабилизирующей среды к 75% вируссодержащей культуральной жидкости.

#### 4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Вирусвакцина против ньюкаслской болезни птиц из штамма "М ВНИИВВиМ" культуральная сухая, рекомендованная для широких производственных испытаний в неблагополучных по этой болезни регионах Российской Федерации.

2. Нормативно-техническая документация -(ТУ на опытную партию, временная инструкция по изготовлению и контролю, временная инструкция по применению), регламентирующая изготовление, контроль и применение вирусвакцины против ньюкаслской болезни птиц из штамма "М ВНИИВВиМ" культуральной сухой, рассмотренная на заседании ученого совета и утвержденная директором ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии..



## 5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Орлов А.А., Южук Т.Э., Смирнов В.Н., Балышева В.И., Кушнир С.Д., Неверовская Н.С. Репродукция полевого изолята вируса ньюкаслской болезни птиц в различных перевиваемых культурах клеток // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: Материалы международной научно-практической конференции / ВНИИВВиМ. - Покров, 2002. - С. 336 - 338.

2. Лагуткин Н.А., Гиченков С.Г., Орлов А.А. Некоторые нюансы вспышек ньюкаслской болезни среди домашних птиц // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды международной научно-практической конференции/ВНИИВВиМ.-Покров, 2003.-С. 131-136.

3. Орлов А.А. Перспектива создания культуральной вакцины против ньюкаслской болезни птиц // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды международной научно-практической конференции / ВНИИВ-ВиМ. - Покров, 2003. - С. 322 - 326.

4. Пантюшенко М.С., Смирнов В.Н., Орлов А.А., Жигалева О.Н. Дифференциация вируса ньюкаслской болезни методом рестрикционного анализа продуктов ПЦР // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды международной научно-практической конференции / ВНИИВВиМ. - Покров, 2003.-С. 457-461.

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ,  
г.Покров Владимирской обл.

Тираж 70 экз.



**№ - 9345**