

КАПУСКИН Егор Вадимович

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЧУМЫ
МЕЛКИХ ЖВАЧНЫХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И
ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

**16.00.03. «Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология, микология
с микотоксикологией и иммунология»**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



003171514

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир

Научный руководитель – доктор ветеринарных наук, профессор
ЗАХАРОВ Валерий Михайлович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
ДУДНИКОВ Андрей Иванович
ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных», г Владимир,

доктор ветеринарных наук
КОЛОМЫЦЕВ Алексей Александрович
ГНУ «Всероссийский научно-
исследовательский институт ветеринарной
вирусологии и микробиологии», г Покров

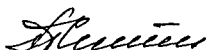
Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно-
исследовательский и технологический
институт биологической промышленности
(ВНИТИБП, г Щелково Московская область)

Защита диссертации состоится "25" июня 2008 г в "10" часов на заседании
диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций
Д 220 015 01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по
адресу 600901, г Владимир, мкр Юрьевец, ФГУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных»

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных»

Автореферат разослан "22" мая 2008 г

Ученый секретарь совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник



Г М Семенова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Чума мелких жвачных (ЧМЖ) - высококонтагиозное, остро или подостро протекающее вирусное заболевание овец и коз, характеризующееся лихорадкой, язвенными поражениями слизистой оболочки ротовой полости, геморрагическим гастроэнтеритом, поражением лимфоидной системы и пневмонией

Первоначально чума мелких жвачных (ЧМЖ) регистрировалась в странах Западной Африки, в последующем ее стали отмечать в Центральной и Восточной Африке, а с 1980 года и на Аравийском полуострове. Сейчас это заболевание имеет широкое распространение на африканском континенте и в Азии.

Чума мелких жвачных в РФ не регистрируется. Но в результате анализа эпизоотической ситуации по ЧМЖ в мире выявлена тенденция приближения нозоареала к границам РФ. Данное заболевание зарегистрировано в следующих государствах: Турции, Афганистане, Казахстане, Таджикистане, Монголии и Китае. И вследствие широких экономических, культурных и других связей со странами, неблагополучными по этому заболеванию, существует реальная угроза заноса ее на территорию нашей страны.

Экономический ущерб, причиняемый ЧМЖ овцеводству и козоводству, велик, так как заболеваемость в первичных очагах болезни может достигать 100%, при высоком уровне летальности. Кроме того, ЧМЖ обуславливает возникновение сопутствующих болезней у животных, что определяет высокий уровень экономических потерь.

В связи с вышеизложенными обстоятельствами, все это обуславливает целесообразность изучения этой важной экзотической болезни, представляющей угрозу для животноводства РФ.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлись анализ эпизоотической ситуации в мире по чуме мелких жвачных, усовершенствование технологических параметров культивирования возбудителя этого заболевания для получения диагностических и вакцинных препаратов.

В задачи исследований входило:

- провести анализ эпизоотической ситуации по ЧМЖ в мире за период 1996-2007 гг.,

- оценить риск заноса этой инфекции на территорию РФ,
- изучить чувствительность различных клеточных культур к вирусу чумы мелких жвачных,
- подобрать оптимальные условия культивирования вируса чумы мелких жвачных, обеспечивающие высокое накопление вирусосодержащего материала,
- разработать технологию изготовления живой вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой,
- провести испытания опытных серий вакцины против чумы мелких жвачных,
- использовать оптимальные условия культивирования вируса при изготовлении специфических антигенов и гипериммунных сывороток

Научная новизна Изучена эпизоотическая ситуация по ЧМЖ в мире за период 1996-2007гг и проведен качественный анализ риска заноса данного заболевания на территорию РФ

Изучены иммунобиологические свойства оригинального вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ»

Исследована чувствительность различных клеточных культур к вирусу ЧМЖ, в результате чего подобрана оптимальная система культивирования

Усовершенствована технология культивирования вируса ЧМЖ, обеспечивающая высокое накопление вирусосодержащего материала для изготовления диагностических препаратов и вирусвакцины против чумы мелких жвачных

Получены экспериментальные серии вирусвакцины против чумы мелких жвачных и проведены испытания их иммунобиологических свойств

Практическая ценность работы На основании проведенных экспериментальных исследований разработана технология культивирования вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» для производства вакцин против ЧМЖ и изготовления диагностических препаратов. Получен производственный вакцинный штамм «ВНИИЗЖ» вируса чумы мелких жвачных, который депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (5 марта 2007 г)

По материалам работы подготовлена, одобрена ученым советом и утверждена директором ФГУ «ВНИИЗЖ» «Методика культивирования и титрования вируса чумы мелких жвачных в перевиваемой культуре клеток Ch-91» (2007 г)

Экспериментальные материалы по оптимизации культивирования вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ» вошли в утвержденные директором ФГУ «ВНИИЗЖ»

- Инструкцию по применению вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой,

- СТО 00495527-0095-2008 на изготовление вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой

Апробация работы Результаты исследований по теме диссертации были опубликованы и доложены на «Международной научной конференции по проблемам животноводства, ветеринарии и кормопроизводства», 16-18 мая 2007 г., Бишкек, КиргНИИЖВиП, на Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых – в ветеринарную практику» 16-18 апреля 2008 г., г. Владимир, и на заседаниях ученого совета ФГУ «ВНИИЗЖ» в 2005-2007 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ, из них две статьи в изданиях, по перечню ВАК

Личный вклад Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы диссертации проводились совместно с к.б.н. А.В. Щербаковым: раздел – «Идентификация вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» (изучение идентичности вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» методом полимеразной цепной реакции), д.б.н. А.П. Пономаревым: раздел – «Идентификация вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» (электронно-микроскопическое исследование), к.в.н. Марковым Г.В. и к.в.н. Онищенко Р.М.: раздел - «Устойчивость вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» при лиофилизации»

Диссертационная работа выполнена в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2005-2008 гг.

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 155 страницах, иллюстрирована 26 таблицами и 18 рисунками. Список используемой литературы включает 227 источников, из которых 164 иностранных.

Основные положения, выносимые на защиту

- условия культивирования вакцинного вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ»,
- характеристика антигенных свойств вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ»,

- технология изготовления вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой,
- результаты лабораторных испытаний иммунобиологических свойств вирусвакцины,
- технология изготовления специфических антигенов и гипериммунных сывороток

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы для исследований

Вирус В работе был использован вирус чумы мелких жвачных, полученный из музея ФГУ «ВНИИЗЖ»

Животные. Для изучения антигенной активности экспериментальной вакцины, проверки на безвредность, реактогенность, реверсibility и возможность контактной передачи вируса были использованы овцы (109 голов) и козы (27 голов) 12-24 месячного возраста

Культуры клеток Для культивирования, титрования и получения высокоактивного вирусного материала с целью изготовления вакцинных препаратов, а также для постановки РИ использовали перевиваемую культуру клеток гонад козы (Ch-91)

На различных этапах работы были использованы следующие культуры клеток первично трипсинизированные - почки ягненка (ПЯ), тестикулы ягненка (ТЯ), почки козленка (ПК), тестикулы козленка (ТК), а также перевиваемые - почки эмбриона КРС (MDBK), почки теленка (RBt), почки сайги (ПС), почки овцы (ПО), почки эмбриона свиньи (СПЭВ), почки свиньи (IB-RS-2), почки новорожденного сирийского хомячка - шведская линия (ВНК-21/13), почки африканской зеленой мартышки (Vero)

Культуры клеток в виде монослоя или суспензии клеток получали из отдела культивирования клеток ФГУ «ВНИИЗЖ»

Реактивы и растворы При культивировании клеток и наработке вируссодержащих материалов использовали поддерживающие среды, приготовленные по стандартным прописям Игла, ПСС, ПСП, раствор Хенкса, ДМЭМ и 199

Питательные среды в готовом виде получали из лаборатории биотехнологии ФГУ «ВНИИЗЖ»

Для культивирования культур клеток в ростовую среду вносили 10% сыворотки КРС, пенициллина 100000 ед, стрептомицина 0,1 г, 10 мл 60%-го раствора L-глутамина на 1 дм³, рН среды – 7,2-7,4

Для культивирования вируса ЧМЖ в питательную среду вносили 2% прогретой при 56°С в течение 30 мин фетальной сыворотки, пенициллин 100000 ЕД, стрептомицин 0,1 г и L-глутамин 10 мл 6%-го раствора на 1 дм³ среды, 7,5% раствором натрия двууглекислого доводили рН до 7,4-7,6

Определение стерильности промежуточных вирусных материалов и изготовленных вакцинных препаратов проверяли высевом на бактериальные среды тиюгликолевую (ТГС), мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА)

При изготовлении лиофилизированных вакцинных препаратов в качестве защитной среды использовали 50% раствор сахарозы, 20% раствор гидролизата лактальбумина, 20% раствор желатозы и гликоловый буфер

Для концентрирования и очистки вируса ЧМЖ использовали 50% раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000 (ПЭГ), 50% раствор полиэтиленimina (ПЭИ), 10% раствор гидроокиси алюминия (ГОА)

На разных этапах исследований использовали фосфатно-буферный раствор, 0,25% раствор трипсина, диспергирующую смесь, состоящую из трипсина и версена в соотношении 9:1

Методы исследований

Культивирование вируса В опытах использовали клеточные культуры, выращенные в матрасах объемом 50 см³, 250 см³ и 1500 см³ общепринятыми методами. Посевная концентрация клеток составляла 300 - 400 тыс кл /см³

Культуры клеток выращивали с использованием ростовой среды с 10% сыворотки крови КРС. При культивировании вируса ростовую питательную среду заменяли на поддерживающую с 2% сыворотки КРС, которую обновляли через каждые 2-3 суток инкубирования. В ростовую и поддерживающую питательные среды с рН 7,2-7,4 добавляли 4% раствор гентамицина из расчета 1 мл раствора на 500 см³ среды. Инкубирование культур вели при температуре 37°С до поражения 80-90% клеток, после чего сосуды с инфицированной культурой клеток замораживали при температуре минус 20°С. Полученные пробы вируссодержащего материала

каждого пассажа титровали в одноименной культуре клеток, используемой для размножения вируса

Определение биологической активности вирусов. Биологическую активность определяли титрованием на соответствующих культурах клеток

Вирусосодержащий материал титровали методом последовательных десятикратных разведений в трехкратной повторности. Зараженную и контрольную культуру клеток выдерживали при температуре 37 °C с заменой питательной среды через каждые 3-4 суток

Результаты титрования учитывали по характерному поражению клеток монослоя в течение 14 суток. Титр вируса рассчитывают по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

Определение уровня вируснейтрализующих антител к вирусу ЧМЖ. Исследуемые сыворотки прогревали в водяной бане при температуре 56°C в течение 30 минут. Для постановки РН готовили двукратные разведения испытуемых сывороток от 1:2 до 1:512 на растворе Хенкса pH 7,2-7,4 с добавлением антибиотиков. Затем готовили необходимый объем вирусного материала, содержащий $1000 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ вируса чумы мелких жвачных и вносили по $0,5 \text{ см}^3$ в каждый пенициллиновый флакон с равным объемом разведенной сыворотки. Пенициллиновые флаконы со смесью вируса и сыворотки встряхивали и оставляли на контакт при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. Затем эту смесь вируса с сывороткой вносили в объеме $0,2 \text{ см}^3$ во флаконы с культурой клеток после удаления ростовой среды и выдерживали при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 1 часа. На каждое разведение сыворотки использовали 4 флакона с культурой клеток. Потом в каждый пенициллиновый флакон вносили по $0,8 \text{ см}^3$ поддерживающей среды. Игла с 2% фетальной сыворотки и антибиотиков. Пенициллиновые флаконы с культурой клеток инкубировали при $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 14 суток со сменой среды через каждые 2-3 суток

Одновременно ставили контроли с заведомо положительной и отрицательной сыворотками, контроль вируса и интактной культуры клеток. Учет реакции нейтрализации проводили после появления цитопатического действия вируса ($100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) в контроле, где оно отмечалось на 10-12 сутки

Изготовление живой лиофилизированной вакцины. Для изготовления вакцины использовали вируссодержащий материал с биологической активностью вируса ЧМЖ не ниже $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

При лиофилизации в клеточную суспензию, содержащую вирус ЧМЖ, добавляли защитную среду из расчета 20% раствор ГЛИА до конечной концентрации 3%, 20% раствор желатозы до конечной концентрации 0,6% и 50% раствор сахарозы до конечной концентрации 3%

Ллиофилизацию вирусвакцин проводили на базе лаборатории болезней птиц совместно с к.в.н. Марковым Г.В. и к.в.н. Онищенко Р.М. в сублимационной установке S M J «Usifroid» (Франция). После окончания сушки камеру установки заполняли сухим стерильным воздухом и герметизировали флаконы по ОСТ 64-7-85-79, в зависимости от объема используемых флаконов при расфасовке вирусвакцины. Флаконы проверяли визуально в проходящем свете на отсутствие трещин и на наличие вакуума при помощи аппарата Д'Арсонваль согласно ГОСТ 28083-89. Массовую долю влажности в высушенном материале определяли согласно ГОСТ 24061-89.

Определение стерильности. Определение стерильности вирусного материала и изготовленных вакцинных препаратов проводили согласно ГОСТ 28085-89.

Определение безвредности вакцины. Испытание вакцинных препаратов на безвредность проводили на двух овцах или двух козах. Вакцина считалась безвредной, если все животные после введения стократной иммунизирующей дозы в объеме $5,0 \text{ см}^3$ в течение срока наблюдения (14 суток) не наблюдалось повышения температуры и отклонений от физиологической нормы.

Определение антигенной активности вакцин. Антигенную активность вакцинных препаратов определяли на трех овцах или трех козах и оценивали по уровню прироста антител в сыворотке крови через 21 сутки после иммунизации. Антитела к вирусу ЧМЖ определяли в реакции нейтрализации.

Проведение качественного анализа риска запаса возбудителя ЧМЖ на территорию РФ. Методологически существует несколько вариантов оценки риска: качественный, полуколичественный и количественный анализ. Безусловно, первый из них является наиболее простым методом, позволяющим получить информацию быстро и в общедоступной форме. Однако полученные в результате качественного

анализа данные не могут трактоваться однозначно, что сводит к минимуму достоинства этого метода. Количественный метод более информативен, но требует наличия широкого спектра точных данных, достаточно длителен, а осознание его результатов без специальной подготовки затруднительно.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Statistica Basic 'Statistics and Tables', а также методов, приведенных в руководстве Ашмарина И.П. (1962 г.)

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Качественный анализ риска заноса ЧМЖ на территорию России

Качественный анализ риска состоит из нескольких этапов идентификации опасности, анализ эпизоотической ситуации, плотности распространения восприимчивых к ЧМЖ животных, приграничной торговли и миграции населения, возможных путей заноса возбудителя ЧМЖ из неблагополучных стран на территорию России.

Источником инфекции являются больные и переболевшие животные.

Восприимчивые животные: овцы и особенно козы, газели, нубийские горные козлы, овцы ларистан, американские белохвостые олени, крупный рогатый скот и буйволы, у двух последних ЧМЖ протекает бессимптомно.

В естественных условиях заражение происходит через пищеварительный тракт, возможно также через слизистую оболочку носовой полости.

Распространению ЧМЖ способствуют неубранные трупы павших и вынужденно убитых животных, шкуры, кишечное сырье, кости, рога, копыта, шерсть.

Исходя из вышеизложенного, можно констатировать, что занос в страну возбудителя заболевания возможен с импортируемыми восприимчивыми животными, мясом и другими продуктами животного происхождения.

Географическое распространение ЧМЖ

На рис. 1 представлены сведения о странах, в которых регистрировали данное заболевание в период с 1996 по 2007 гг.

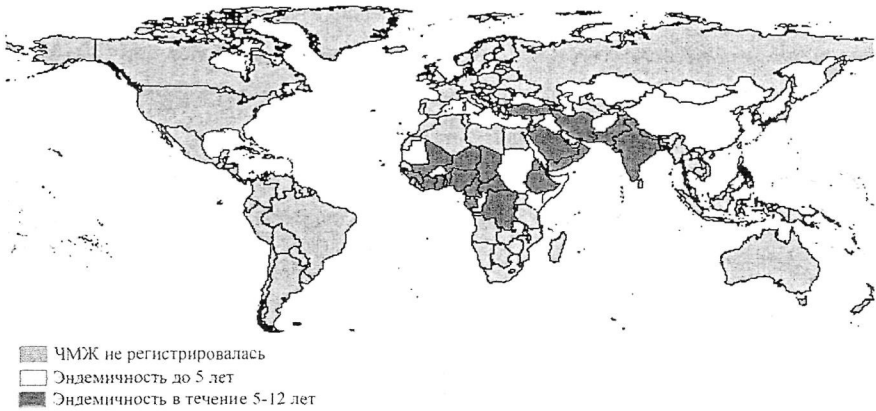


Рис. 1. Географическое распространение ЧМЖ за период 1996-2007 гг.

Из рис. 1 следует, что наибольшее географическое распространение ЧМЖ получила в Западной и Центральной Африке, Аравийском полуострове, в странах Ближнего Востока и Азии (эндемичность от 5 до 12 лет).

В результате анализа данных эпизоотического процесса в мире за период с 1996 по 2007 гг. по чуме мелких жвачных была выявлена тенденция динамического распространения болезни в 2001-2004 гг. (в 1996 г. было 20 неблагополучных стран, а в 2001, 2002, 2003, 2004 гг. - 27, 32, 32, 31, соответственно). Также выявлено приближение нозоареала к границам РФ (в Турции впервые ЧМЖ была зарегистрирована в 1999 г., в Монголии - 2001 г., в Афганистане - 2002 г., в Таджикистане - 2002 г., в Казахстане - 2003 г. и в Китае в 2007 г.).

Предположительно ЧМЖ распространилась гораздо шире, так как она могла протекать латентно. Также необходимо отметить, что многие страны не предоставляют данные о вспышках в МЭБ или подают их с запозданием, что усложняет анализ распространения ЧМЖ в мире.

Таким образом, можно предположить, что наибольшую угрозу РФ в отношении возможности заноса возбудителя ЧМЖ представляет распространение болезни в следующих государствах: Турции, Афганистане, Иране, Индии, Пакистане, Казахстане, Таджикистане, Монголии, Китае.

Анализируя влияние факторов (плотность восприимчивого поголовья, близость к границам неблагополучных государств) можно предположить, что эта болезнь представляет максимальную угрозу для Южного федерального округа из-за

сосредоточения в нем наибольшего количества восприимчивого поголовья животных, близостью к неблагополучным регионам по ЧМЖ и наиболее подходящими климатическими условиями. Имеется большой риск заноса ЧМЖ в Республики Тыва и Алтай, непосредственно граничащих с Монголией.

Следующими факторами, способными влиять на эпизоотическую обстановку по ЧМЖ являются приграничная торговля и миграция. По интенсивности вышеуказанных процессов на первом месте находится Южный федеральный округ, куда не исключен нелегальный завоз животных из Турции и Ирана через Грузию, Абхазию и Южную Осетию.

Республики Татарстан и Башкортостан, имеющие высокую концентрацию овец и коз, хотя и удалены от неблагополучных по ЧМЖ территорий, тем не менее, могут считаться угрожаемыми по ЧМЖ, так как возможен занос возбудителя в эти республики по крупным транспортным линиям из Казахстана и Монголии.

В связи со сложной экономической ситуацией в странах Центральной Азии и относительно низким уровнем жизни населения не исключено, что мигрирующее население перевозит в Россию продукты животного происхождения.

В Центральный федеральный округ, характеризующийся наличием развитой инфраструктуры, вероятность заноса ЧМЖ незначительна в связи с низкой плотностью восприимчивого поголовья и слабой восприимчивостью к возбудителю ЧМЖ местных пород животных.

Анализируя вышеизложенное можно констатировать, что вероятными путями заноса возбудителя ЧМЖ из неблагополучных стран на территорию России являются нелегальный импорт животных и животноводческих продуктов, легальный импорт мясопродуктов, продукты питания туристов/мигрантов, автотранспорт (перевозящий животных и животноводческую продукцию), «естественное» распространение в приграничной зоне, контаминированные корма и фураж (в т.ч. зерновые), отходы с бортов железнодорожных составов, отходы с бортов авиалайнеров и судов, дикие восприимчивые животные, аэрогенное распространение, биотерроризм.

Из перечисленных выше факторов наиболее вероятным путем заноса ЧМЖ является нелегальный импорт животных и продуктов животноводства из неблагополучных государств.

Есть и другой возможный путь заноса ЧМЖ на территорию России - это легальный импорт животных и продуктов животного происхождения. Процесс импорта в РФ пользовательского и убойного скота регламентирован только при ввозе овец и коз.

Изучение чувствительности клеточных систем к вирусу ЧМЖ. В настоящее время культуры клеток являются основной биологической системой для выращивания вирусов. Определение наиболее чувствительных к вирусу клеточных систем необходимо для получения вирусосодержащего сырья с высокой биологической активностью для изготовления вакцинных и диагностических препаратов.

Репродуктивную активность вируса ЧМЖ изучали в различных клеточных системах: первично трипсинизированных - ПЯ, ТЯ, ПК, ТК, перевиваемых - MDBK, СПЭВ, ПО, ПС, RBt, IB-RS-2, BHK-21, Vero, Ch-91. В опытах использовали клеточные культуры, выращенные в матрасах объемом 50 см³ или 250 см³ общепринятыми методами.

Полученные пробы вирусосодержащего материала каждого пассажа титровали в одноименной культуре клеток, используемой для размножения вируса. Культивирование вакцинного вируса в этих клеточных системах проводили в течение 5 последовательных пассажей.

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее активные вирусные материалы получены в культуре клеток Ch-91, на уровне 5-го пассажа титр вируса составлял $6,21 \pm 0,31 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Наименее чувствительными культурами клеток оказались RBt, BHK-21 и СПЭВ, титр на уровне пятого пассажа составлял $1,26 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $3,50 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, $4,00 \pm 0,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Во всех культурах клеток, за исключением RBt, наблюдалась тенденция к увеличению биологической активности в зависимости от пассажа. При культивировании вируса ЧМЖ в культуре клеток RBt наблюдалась тенденция к уменьшению биологической активности в зависимости от числа пассажей, что может объясняться низкой чувствительностью данной культуры клеток к вирусу. В остальных культурах вирус накапливался в пределах $4,47-5,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Наибольшая чувствительность к вирусу ЧМЖ установлена при заражении перевиваемых культур клеток Ch-91, MDBK и Vero. Цитопатическое действие вируса проявлялось в первом пассаже на 7 сутки, а в третьем пассаже – на 2-3 сутки.

Изучение репродукции вируса ЧМЖ в культуре клеток Ch-91 при разной множественности инфицирования. Для этого формировали четыре группы по 45 флаконов (50 см^3) с полностью сформировавшимся монослоем культуры клеток Ch-91, культуру клеток в каждой группе инфицировали вирусом ЧМЖ при множественности инфицирования 1,0, 0,1, 0,01 и 0,001 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ и инкубировали при 37°C со сменой среды через 2-3 суток. Через каждые сутки после инфицирования из групп брали по 3 флакона с инфицированной культурой клеток на протяжении 15 суток и промораживали их при минус 20°C . После оттаивания определяли активность вируса методом титрования в культуре клеток Ch-91. Результаты опыта представлены на рис. 2.

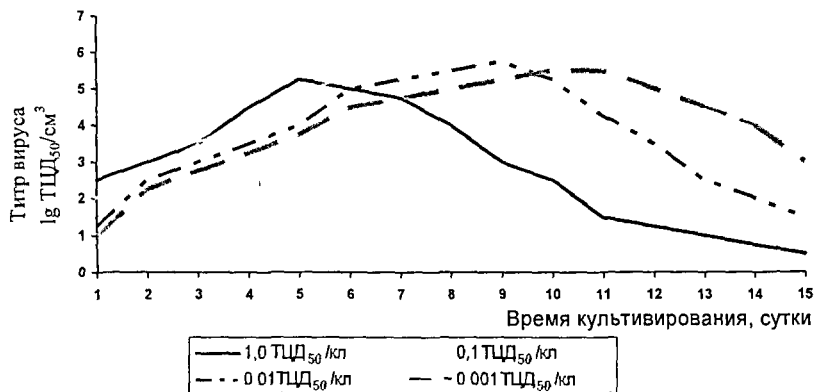


Рис 2 Накопление вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» в культуре клеток Ch-91 при различной множественности заражения

Данные рис. 2 показывают, что при множественности инфицирования 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ на 7-8 сутки активность вируса в суспензии достигала 6,00-6,25 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При увеличении множественности заражения до 1,0 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$ накопление вируса шло более быстро, но при этом снижалась биологическая активность до 5,25 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Это может объясняться тем, что большая заражающая доза вируса способствует образованию и накоплению дефектных и интерферирующих частиц, которые в дальнейшем обеспечивают персистенцию вируса ЧМЖ в культуре клеток.

При множественности заражения 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл из-за интенсивной пролиферации клеток (пораженные клетки замещались вновь выросшими) титр вируса снижался до 5,50-5,75 lg ТЦД₅₀/см³, также при этом увеличивалось время культивирования до 9-11 суток

Из данных, представленных на рис 2, видно, что уровень накопления вируса после шести суток культивирования практически не менялся и находился на уровне 6,0-6,25 lg ТЦД₅₀/см³, однако значительно превышал показатель в период до 4 суток и после 9 суток выращивания. Следовательно, оптимальным сроком сбора урожая вируса следует считать время культивирования - 6-8 суток. При появлении ЦПД (округление клеток, повышение их оптической плотности, дегенерация и отделение клеток от стекла) на 70-90% монослоя накопление вируса ЧМЖ было максимальным.

Накопление вируса в зависимости от вида питательной среды. Питательная среда представляет собой раствор определенного состава. Минеральные компоненты в этом растворе подобраны так, что он выполняет буферные функции, поддерживая постоянный кислотно-щелочной баланс среды в процессе культивирования. Среда обеспечивает питание клеток, их пролиферацию и дифференцировку.

Для определения влияния различных поддерживающих сред на репродукцию вируса в опытах были использованы следующие среды: ПСС, ПСП, Игла (по прописям ФГУ «ВНИИЗЖ»), Игла + ПСП в соотношении 1:1, 199 и ДМЕМ. В каждую среду добавляли 2% фетальной сыворотки и инкубировали до появления ЦПД на 80-90% монослоя. Активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток Ch-91.

По результатам исследований установлено, что наиболее активное накопление вируса отмечалось при использовании питательной среды Игла, где титр составлял $5,82 \pm 0,17$ lg ТЦД₅₀/см³ и ПСС- $5,69 \pm 0,08$ lg ТЦД₅₀/см³. В случае использования поддерживающей среды 199 вирус накапливался в сравнительно низких титрах ($4,33 \pm 0,19$ lg ТЦД₅₀/см³).

Зависимость репродукции вируса ЧМЖ от вида сыворотки в поддерживающей среде. Сыворотка представляет собой чрезвычайно сложную смесь мелких и крупных молекул, способных как вызывать, так и тормозить рост и репродукцию клеток.

Изучение накопления вируса ЧМЖ проводили с использованием различных видов сывороток крови инаktivированных - фетальной, КРС, ягненка, лошади, неинаktivированных - фетальной, КРС Контролем служила среда без добавления сыворотки Результаты исследований представлены в табл 1

Таблица 1

Зависимость репродукции вируса от вида сыворотки в поддерживающей среде

Доза заражения (ТЦД ₅₀ /кл)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)						Среда без добавления сыворотки
	Среда с добавлением 2% сыворотки крови						
	Фетальная ин	фетальная	КРС ин.	КРС	ягненка ин	лошади ин	
Среда Игла							
0,1	6,39±0,25	4,45±0,23	5,75±0,14	3,09±0,08	4,75±0,16	4,65±0,23	3,75±0,11
0,01	6,00±0,11	4,27±0,22	5,55±0,25	3,25±0,28	5,08±0,15	4,35±0,61	3,07±0,17
0,001	5,75±0,13	4,19±0,18	5,47±0,23	3,13±0,34	5,10±0,25	4,12±0,21	2,51±0,09
Среда ПСС							
0,1	6,00±0,31	3,75±0,13	5,03±0,24	2,85±0,27	4,51±0,31	4,05±0,25	2,73±0,05
0,01	5,91±0,29	4,71±0,28	4,61±0,11	3,45±0,43	5,07±0,14	4,55±0,20	2,73±0,24
0,001	5,42±0,12	3,69±0,35	4,53±0,16	3,14±0,50	4,52±0,26	4,21±0,26	3,01±0,18

Как видно из табл 1, наибольшее накопление вируса отмечалось при использовании инаktivированной 2% фетальной сыворотки и среды Игла, а также дозы заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл, где титр составлял 6,39±0,25 lg ТЦД₅₀/см³ Достаточно высокие титры вируса были и при использовании инаktivированной фетальной сыворотки, среды ПСС и дозы заражения 0,1, 0,01 ТЦД₅₀/кл, а также при использовании питательной среды Игла и дозы заражения 0,01, 0,001 ТЦД₅₀/кл, титр составлял от 5,75 до 6,00 lg ТЦД₅₀/см³ Внесение среды Игла с инаktivированной сывороткой КРС и множественностью заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл вызывало накопление вируса в титре 5,75±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ Более низкий показатель биологической активности вируса отмечался при использовании сред без добавления сыворотки, а также неинаktivированной сыворотки КРС Установлено, что при использовании неинаktivированных сывороток титр вируса был ниже на 1,0-2,0 lg ТЦД₅₀/см³

Из вышесказанного следует, что для получения вируса с высокой биологической активностью необходимо использование инаktivированной фетальной сыворотки, а при наработке вирусной суспензии для изготовления вакцин экономически целесообразно использовать в составе поддерживающих сред инаktivированную сыворотку КРС

Влияние системы культивирования на репродукцию вируса Одним из путей повышения эффективности производства вирусных препаратов является выращивание вируса в роллерных сосудах

Культуры клеток MDBK, Vero и Ch-91, выращенные в матрасах и в роллерных сосудах, инфицировали вирусом с множественностью заражения 0,1 ТЦД₅₀/кл. Накопление вируса контролировали по титру биологической активности

По результатам исследований установлено, что при роллерном способе культивирования на протяжении пяти пассажей во всех клеточных системах накопление вируса было больше, чем при стационарном способе культивирования, разница составляла 0,25-0,50 lg ТЦД₅₀/см³ и была недостоверной при статистической обработке. Наибольшее накопление вируса отмечалось при роллерном культивировании в культуре клеток Ch-91, к пятому пассажу титр вируса составлял 6,49±0,19 lg ТЦД₅₀/см³. Наименьшее накопление вируса отмечалось в культуре клеток Vero, где титр составлял 5,59±0,14 lg ТЦД₅₀/см³ (стационарный способ культивирования) и 5,67±0,13 lg ТЦД₅₀/см³ (роллерный способ культивирования).

Устойчивость лиофилизированных материалов вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» при хранении Для изучения устойчивости штамма «ВНИИЗЖ» в лиофилизированных препаратах готовили по три партии сухих препаратов с каждой стабилизирующей средой и размещали на хранение при температуре 4 °С. Через 3, 6, 9, 12, 18, 24 месяца хранения из каждой партии извлекали по 3 флакона, содержимое их ресуспендировали до первоначального объема поддерживающей средой, смешивали и определяли биологическую активность вируса методом титрования в культуре клеток Ch-91.

Степень снижения активности вируса оценивали по разнице титров исходных и хранящихся материалов. Результаты сохраняемости лиофилизированных материалов штамма «ВНИИЗЖ» с различными стабилизирующими добавками при различных температурах хранения приведены в табл. 2.

Таблица 2

Устойчивость лиофилизированных материалов штамма «ВНИИЗЖ» при температуре 4 °С

№№ Пропи сей сред	Состав стабилизирующих сред	Титр после сушки	Активность вируса через месяцы хранения в Ig ТЦД ₅₀ /см ³						Внешний вид продукта в процессе хранения
			3	6	9	12	18	24	
1	сахароза 3%, желатоза 0,6%	5,22±0,18	5,03±0,12	4,23±0,19	3,57±0,23	3,18±0,16	2,22±0,18	1,95±0,52	таблетка слегка деформировалась
2	сахароза 3%, декстран 0,6%	5,17±0,14	4,57±0,25	4,06±0,13	3,34±0,22	2,87±0,14	1,75±0,14	1,08±0,22	таблетка слегка деформировалась
3	мальтоза 3%, желатоза 0,6	4,67±0,30	4,50±0,00	4,07±0,08	3,75±0,14	3,25±0,28	2,63±0,31	2,15±0,25	таблетка деформировалась
4	мальтоза 3%, декстран 0,6%	4,75±0,14	4,68±0,13	4,17±0,19	3,76±0,22	3,15±0,18	2,68±0,11	2,09±0,26	таблетка деформировалась
5	ГЛА 3%, сахароза 3%, желатоза 0,6%	5,38±0,12	5,36±0,14	5,30±0,22	5,27±0,19	5,21±0,36	5,20±0,25	5,18±0,14	не изменился
6	ГЛА 3%, сахароза 3%, декстран 0,6%	5,41±0,07	4,72±0,19	4,56±0,25	4,16±0,22	3,94±0,52	3,50±0,07	3,13±0,62	таблетка слегка деформировалась
7	ГЛА 3%, мальтоза 3%, желатоза 0,6%	4,67±0,08	4,25±0,14	4,00±0,29	3,61±0,10	3,18±0,16	2,50±0,28	1,83±0,08	таблетка слегка деформировалась
8	ГЛА 3%, мальтоза 3%, декстран 0,6%	5,27±0,14	5,17±0,04	4,90±0,28	4,58±0,30	4,12±0,36	3,82±0,22	3,27±0,12	таблетка слегка деформировалась
9	пептон 4%, сахароза 3%, желатоза 0,6%	4,98±0,25	4,88±0,16	4,50±0,34	4,26±0,27	4,08±0,19	3,96±0,08	3,68±0,15	не изменился
10	пептон 4%, сахароза 3%, декстран 0,6%	5,32±0,15	5,31±0,17	5,26±0,23	5,20±0,08	5,17±0,59	5,00±0,14	4,85±0,23	не изменился
11	пептон 4%, мальтоза 3%, желатоза 0,6%	4,77±0,13	4,57±0,23	4,21±0,36	3,77±0,15	3,35±0,17	3,05±0,24	2,75±0,19	таблетка слегка деформировалась
12	пептон 4%, мальтоза 3%, декстран 0,6%	5,21±0,11	5,01±0,23	4,67±0,22	4,45±0,25	4,26±0,14	4,03±0,12	3,95±0,28	таблетка слегка деформировалась
13	пептон 4%, сахароза 3%	5,07±0,19	4,84±0,29	4,49±0,14	4,12±0,50	3,90±0,06	3,58±0,16	3,21±0,08	таблетка слегка деформировалась
14	пептон 4%, мальтоза 3%	5,13±0,28	4,85±0,35	4,56±0,19	4,32±0,41	3,99±0,14	3,58±0,28	3,12±0,22	таблетка слегка деформировалась
15	ГЛА 3%, сахароза 3%	5,27±0,42	5,00±0,24	4,59±0,17	4,07±0,12	3,62±0,31	3,15±0,22	2,69±0,18	таблетка деформировалась
16	ГЛА 3%, мальтоза 3%	5,34±0,23	4,81±0,25	4,46±0,11	3,88±0,19	3,12±0,14	2,27±0,20	1,19±0,14	таблетка стала рыхлой
17	без стабилизаторов (контроль)	3,50±0,14	2,07±0,19	0,54±0,22	0	0	0	0	таблетка сильно деформировалась

Как видно из табл 2, вирус ЧМЖ, высушенный без каких либо стабилизаторов, сравнительно быстро инактивировался

Лучшим защитным эффектом в лиофилизированных препаратах обладали стабилизирующие добавки по прописям №№ 5, 6, 9. Добавки по прописям №№ 5 и 9, 10 обеспечивали наилучший товарный вид препарата при хранении

Таким образом, проведенные испытания по сохранности лиофилизированного вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» в присутствии различных стабилизаторов позволили сделать выбор состава стабилизаторов для длительного хранения препарата. Таковой оказалась защитная среда, содержащая ГЛА 3%, сахарозы 3%, желатозы 0,6%

Изучение безвредности и реактогенности вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ». С этой целью вирусосодержащий материал вводили двум овцам и козам 12-мес возраста и козлятам 3-мес возраста, в объеме 5 см^3 с содержанием вируса $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. За животными вели наблюдение с ежедневным измерением температуры тела в течение 21 суток

Через 7, 14, 21 сутки после иммунизации от животных получали пробы крови, сыворотки которых исследовали в РН и ИФА

Результаты наблюдений показали, что у одного козленка регистрировалось повышение температуры до $39,9^\circ\text{C}$. Других каких-либо отклонений от физиологической нормы не отмечали. Исследование сывороток крови показало, что специфические антитела обнаруживались уже на 7 сутки в низких титрах (1/40 в ИФА), а на 14 и 21 сутки они выявлялись в сравнительно высоких титрах (до 1/320 – 1/640 в ИФА)

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что вирус ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» является слабо реактогенным для овец и коз

Реверсibilitätность и контагиозность вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ»
Одним из важнейших требований к вакцинным штаммам является отсутствие реверсibilitätности и контагиозности для животных

Для определения реверсии вирус вводили подкожно в дозе $10^{5,0} \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ двум ягнятам в объеме 5 см^3 на голову. Через шесть суток у этих ягнят отбирали кровь в объеме 20 см^3 для получения вирусосодержащих лимфоцитов крови и одного из них умертвили для отбора лимфатических узлов (предлопаточных,

подчелюстных, паховых, мезентеральных) Из лимфатических узлов готовили 20%-ю суспензию на стерильном физиологическом растворе (рН=7,2-7,4) Каждый из полученных вирусосодержащих материалов (суспензия лимфоцитов крови после трехкратной заморозки-оттаивания и 20%-я суспензия из лимфоузлов) вводили подкожно в разные точки подмышечной области следующим двум ягнятам в объемной дозе по 5 см³ Аналогичным способом провели пять последовательных пассажей В каждом из полученных вирусосодержащих материалов проверяли наличие вируса методом ПЦР, результаты проверки представлены в табл 4 За животными на протяжении 5 пассажей вируса вели клинические наблюдения в течение 21 суток

Таблица 3

Результаты определения реверсibilityности вируса чумы мелких жвачных животных штамма «ВНПЗЖ»

Наименование вирусосодержащего материала	Номер пассажа на ягнятах				
	1	2	3	4	5
Лимфоциты	+	-	-	-	-
20%-я суспензия из лимфоузлов	+	-	-	-	-

По результатам опыта установлено, что вирус является стабильным и нереверсibilityным, так как повышения температуры тела и симптомов болезни чумы мелких жвачных у животных не наблюдалось Местная реакция на введение вирусосодержащей суспензии отсутствовала Необходимо отметить тот факт, что геном вируса ЧМЖ обнаруживался только в вирусосодержащем материале первого пассажа, на втором пассаже возбудитель не обнаруживался, что свидетельствовало об отсутствии реверсии

Возможность контактной передачи вируса изучали при совместном содержании двух ягнят и двух козлят, привитых вирусным материалом с титром биологической активности 5,0 lg ТЦД₅₀/см³, и интактных животных (двух козлят трехмесячного возраста) Через 21 сутки у всех животных определяли в сыворотках крови уровень антител к вирусу ЧМЖ методом непрямого варианта ИФА У козлят, находящихся в контактной группе, в сыворотках крови не обнаружили специфических к вирусу ЧМЖ антител, тогда как у привитых животных титр был в пределах 1 320 – 1 640

Таким образом, контактная передача вакцинного вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» животным не установлена

Изучение антигенных свойств вируса ЧМЖ. Антигенную активность вируса оценивали по способности его вызывать образование вируснейтрализующих антител у овец и коз

Для подбора наиболее технологичной системы культивирования изучали антигенные свойства вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ», в зависимости от системы репродукции. Для этого вирус культивировали в культурах клеток Vero, MDBK и Ch-91. Затем каждый полученный вируссодержащий материал вводили трем овцам 12-24-мес. возраста в дозе $100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Данные этих исследований представлены в табл. 4.

Таблица 4

Изучение иммунобиологических свойств вакцинного вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» в зависимости от системы репродукции

Доза вируса	Тип антител в РИ, $\log_2$		
	срок после иммунизации, суток		
	7	14	21
Ch-91			
$100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	$2,09 \pm 0,07$	$5,14 \pm 0,21$	$6,94 \pm 0,17$
Vero			
$100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	-*	$4,21 \pm 0,09$	$6,01 \pm 0,21$
MDBK			
$100 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	-	$4,76 \pm 0,13$	$5,55 \pm 0,37$

*- вируснейтрализующие антитела не обнаружены

Как видно из табл. 4, наибольший титр вируснейтрализующих антител $6,94 \pm 0,17 \log_2$ был получен с вирусом, который культивировался в культуре клеток Ch-91. Также необходимо отметить, что вируснейтрализующие антитела на 7 сутки регистрировались только у трех овец, тогда как на 14 сутки антитела обнаруживались у всех животных в титрах от $4,21 \pm 0,09$ до $5,14 \pm 0,21 \log_2$.

Вакцинопрофилактика животных должна быть экономичной и эффективной. В связи с этим была определена минимальная доза иммунизации для овец и коз, вирус культивировали в культуре клеток Ch-91. С этой целью вирусом прививали трех овец и трех коз 12-48-мес. возраста, подкожно в различных дозах и исследовали в реакции нейтрализации сыворотки крови от этих животных, взятые на 7, 14, 21 сутки после прививки. Данные представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Результаты определения оптимальной дозы вируса при иммунизации
овец и коз**

Доза вируса ТЦД ₅₀ /см ³	Вид животного					
	овцы			козы		
	Титр вируснейтрализующих антител, log ₂					
	срок после иммунизации, суток					
	7	14	21	7	14	21
10000	2,27±0,11	5,76±0,31	7,91±0,17	1,63±0,04	5,81±0,19	7,57±0,18
1000	1,07±0,22	5,05±0,51	6,84±0,61	1,35±0,11	5,17±0,46	6,68±0,24
100	1,15±0,14	4,95±0,05	6,31±0,25	1,08±0,33	4,64±0,33	6,12±0,44
10	-*	1,7±0,14	2,65±0,07	-	2,00±0,11	2,75±0,13

*- вируснейтрализующие антитела не обнаружены

Данные табл 5 свидетельствуют, что при иммунизации животных в дозе 10 ТЦД₅₀/см³ у них индуцировались вируснейтрализующие антитела на 21 сутки в титрах у овец 2,65±0,07 log₂ и у коз 2,75±0,13 log₂. По информации МЭБ, данный уровень антител является недостаточным для надежной защиты животных от ЧМЖ. Иммунизация животных вакцинным вирусом ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» в дозе 100 ТЦД₅₀/см³ стимулировала у них формирование на 21 сутки вируснейтрализующих антител у овец на уровне 6,31±0,25 log₂ и у коз 6,12±0,44 log₂. При увеличении дозы вируса до 1000 ТЦД₅₀/см³ наблюдалось незначительное увеличение образования антител в среднем на 0,5 log₂. Из вышеперечисленного следует, что оптимальной дозой вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» для иммунизации животных является 100 ТЦД₅₀/см³. Исследования показали, что уровень антител у овец и коз в среднем был одинаковым. Следовательно вирус ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» обладал выраженными антигенными свойствами для овец и коз при применении в дозе 100 ТЦД₅₀/см³.

Концентрирование и очистка вируса ЧМЖ Для получения очищенного и концентрированного антигена использовали химические и физические методы. На основании анализа данных литературы по очистке и концентрированию РНК-содержащих вирусов и собственного опыта работы с возбудителем ЧМЖ были отобраны следующие методы:

- осаждение вируса 4% раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ),
- осаждение вируса 8% раствором ПЭГ,
- осаждение вируса 8% раствором ПЭГ с добавлением 0,1% ГОА,

- механический способ снятия монослоя,
- снятие монослоя раствором трипсина

Осаждение вируса при помощи ПЭГ (1, 2, 3 методы) Для концентрирования использовали ПЭГ-6000 в виде 50%-го стерильного раствора. Очистку вирусосодержащей суспензии для освобождения от чужеродных белков проводили с использованием 10%-го раствора полиэтиленimina

Для высвобождения из клеток вируса проводили 3-кратное замораживание–оттаивание вирусосодержащей суспензии, после чего осветляли низкоскоростным центрифугированием при 1000 об/мин в течение получаса, надосадок отбирали. В полученную смесь добавляли ПЭГ-6000 до конечной концентрации 8% или 4% (в зависимости от метода) и 0,15 М раствор NaCl, а при отработке третьего метода добавляли ГОА до 0,1%, затем суспензию инкубировали при 4°C в течение 12 ч. После осаждения вируса ПЭГ вирусосодержащую суспензию повторно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 1ч, надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в фосфатно-буферном растворе до конечного объема суспензии, равного 1,25% исходного объема.

Очищали суспензию внесением 1/10 объема 10% раствора ПЭИ с последующим центрифугированием суспензий при 1000 об/мин в течение 15 мин. Вирусосодержащую надосадочную жидкость использовали в опытах.

Механический способ снятия монослоя инфицированной культуры клеток Ch-91 Монослой снимали петлей в фосфатно-буферном растворе до конечного объема суспензии, равного 1,25% исходного объема. Для высвобождения вируса из клеток проводили 3-кратное замораживание–оттаивание вирусосодержащей суспензии, потом центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 минут, надосадок отбирали.

Снятие инфицированного монослоя культуры клеток Ch-91 раствором трипсина Данный метод отличался от предыдущего только тем, что монослой снимался не петлей, а 0,25%-м раствором трипсина. Все остальные манипуляции как в предыдущем методе.

Биологическую активность полученных препаратов определяли путем их титрования на культуре клеток Ch-91. Данные представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты концентрирования вируса ЧМЖ

Метод концентрирования	Биологическая активность, lg ТЦД ₅₀ /см ³
Осаждение вируса 4% раствором ПЭГ	7,25±0,14
Осаждение вируса 8% раствором ПЭГ	7,54±0,11
Осаждение вируса 8% раствором ПЭГ с добавлением 0,1% ГОА	2,31±0,24
Механический способ снятия монослоя	5,07±0,19
Монослой снимали раствором трипсина	2,83±0,20
Исходный материал	5,77±0,21

В результате проведенных исследований установлено, что наибольший титр вируса был отмечен в концентрате с 4 и 8% ПЭГ и составлял 7,25 и 7,5 lg ТЦД₅₀/см³, соответственно

Гипериммунизация животных. Антигенную активность очищенных и концентрированных препаратов изучали на овцах. Были сформированы 8 групп животных. Каждая опытная группа включала 3 головы. Инокуляцию антигенов проводили внутримышечно и подкожно с внутренней поверхности бедра трехкратно с интервалом в 7 суток. Контрольным животным вводили плацебо. Отбор проб крови для получения иммунных сывороток производили перед каждой иммунизацией и через 21 сутки после третьего введения антигенов. Результаты исследования антигенной активности вируса ЧМЖ представлены в табл. 7

Таблица 7

Вируснейтрализующая активность гипериммунных сывороток

Метод концентрирования	Гипериммунизация			
	подкожная		внутримышечная	
	без адьюванта	неполный адьювант Фрейнда	без адьюванта	неполный адьювант Фрейнда
Осаждение вируса 4%-м раствором ПЭГ	8,75±0,56	9,61±0,24	9,14±0,36	10,48±0,17
Исходный материал	8,53±0,50	9,24±0,36	9,02±0,43	9,45±0,44
Контроль	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Результаты табл 7 демонстрируют, что высокий титр вируснейтрализующих антител в сыворотке был отмечен с использованием антигена, полученного с помощью 4% ПЭГ, и внутримышечной инокуляции с неполным адьювантом Фрейнда (титр составлял $10,48 \pm 0,17 \log_2$). Необходимо отметить тот факт, что во всех случаях при использовании адьюванта и при внутримышечной инъекции титр был выше, чем без адьюванта и при подкожной инъекции. Исходя из вышеизложенного установлено, что для получения гипериммунных сывороток необходимо использовать специфические антигены, полученные осаждением вируса 4% ПЭГ, с неполным адьювантом Фрейнда и при 3-кратной инокуляции внутримышечно.

4. ВЫВОДЫ

- 1 Анализ эпизоотической ситуации по чуме мелких жвачных в странах мира за период 1996-2007 гг показал, что это заболевание овец и коз имеет широкое распространение, особенно в Западной и Центральной Африке, Аравийском полуострове и Азии, а в последние годы выявлена тенденция приближения нозоареала к границе РФ. Качественный анализ риска заноса заболевания в РФ свидетельствует о высокой вероятности возникновения чумы мелких жвачных в России.
- 2 Установлено, что наибольшей вирусрепродуцирующей способностью к вирусу чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ» обладали перевиваемые культуры клеток Ch-91, Vero и MDBK.
- 3 Показано, что максимальное накопление вируса чумы мелких жвачных в титрах $6,5-6,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ происходит в культуре клеток Ch-91, при множественности заражения 0,1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{кл}$, с применением поддерживающей среды Игла и с 2% инактивированной фетальной сыворотки, стационарном способе культивирования и сборе вирусного материала при 80% поражения монослоя.
- 4 Установлено, что лучшими защитными свойствами при лиофилизации вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ» обладает среда, содержащая в конечной концентрации 3% ГЛА, 3% сахарозы, 0,6% желатозы, которая обеспечивает возможность использования вирусвакцины в течение двух лет при температуре хранения 4°C .

- 5 Установлено, что изготовленные вирусвакцины против чумы мелких жвачных из штамма «ВНИИЗЖ» безвредные и ареактогенные для овец и коз, не контагиозные при контакте вакцинированных и интактных животных, не реверсильные при пассировании на овцах и козах
- 6 Показано, что вирусвакцина против чумы мелких жвачных обладает ярко выраженными антигенными свойствами и индуцирует выработку вируснейтрализующих антител в титре 6,0-7,0 $\log_2$, что соответствует международным требованиям Установлено, что оптимальная иммунизирующая доза для овец и коз составляет 100 ТЦД₅₀/см³
- 7 Установлено, что оптимальным способом получения специфических антигенов вируса чумы мелких жвачных является осаждение вируса ПЭГ-6000 в конечной концентрации 4% с дальнейшей очисткой ПЭИ, в результате титр вируса повышается на 1,50 lg ТЦД₅₀/см³ При гипериммунизации животных данным антигеном специфические сыворотки крови имеют титр 10,48±0,17 $\log_2$ в РН
- 8 Воспроизводимость разработанной технологии культивирования вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ», обеспечивает наработку высокоактивного вирусного материала для изготовления диагностических и вакцинных препаратов, подтверждена комиссионными испытаниями с участием сотрудников ФГУ «ВГНКИ»

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных экспериментальных исследований разработана технология культивирования вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» для производства вакцин против ЧМЖ и изготовления диагностических препаратов Получен производственный вакцинный штамм «ВНИИЗЖ» вируса чумы мелких жвачных, который депонирован в коллекции микроорганизмов ФГУ «Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (5 марта 2007 г.)

По материалам работы подготовлена, одобрена ученым советом и утверждена директором ФГУ «ВНИИЗЖ» «Методика культивирования и титрования вируса чумы мелких жвачных в перевиваемой культуре клеток Ch-91» (2007 г.)

Экспериментальные материалы по оптимизации культивирования вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ» вошли в утвержденные директором ФГУ «ВНИИЗЖ»

- Инструкцию по применению вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой,

- СТО 00495527-0095-2008 на изготовление вирусвакцины против чумы мелких жвачных культуральной сухой

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Капускин, Е В. Изучение чувствительности клеточных культур к вакцинному вирусу чумы мелких жвачных штамма "ВНИИЗЖ"/ Е В Капускин // Вестник Кыргызского научного-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени Арстанбека Дуйшеева (КыргНИИЖВиП) - Бишкек, 2007 - № 1 -С 212-215
- 2 Изучение иммунобиологических свойств вакцинного штамма «ВНИИЗЖ» вируса чумы мелких жвачных / Е.В. Капускин, Н И Ковалишина, Б Л Манин, В В Борисов // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов материалы международной научно-практической конференции - Щелково, 2007 -С 110-113
- 3 Биологические свойства вакцинного штамма «ВНИИЗЖ» вируса чумы мелких жвачных / Е В Капускин, Н И Ковалишина, А М Евсеев, В И Диев, А П Пономарев, В В Борисов, В М Захаров // Вестник Кыргызского научного-исследовательского института животноводства, ветеринарии и пастбищ имени Арстанбека Дуйшеева (КыргНИИЖВиП) - Бишкек, 2007 - № 2 -С 154-158
- 4 Капускин, Е.В. Изучение культуральных свойств вакцинного вируса ЧМЖ штамма «ВНИИЗЖ» / Е В Капускин // Ветеринарная патология – 2007 - №4(23) - С 42-45
- 5 Капускин, Е В. Качественный анализ риска заноса чумы мелких жвачных на территорию России / Е В Капускин // Ветеринарная патология – 2007 - №4(23) - С 18-24