



Филатова Мария Александровна

**Получение и паспортизация
селекционированного штамма РБ-71/10 вируса бешенства**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Работа выполнена в Государственной научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ)

Научный руководитель

доктор ветеринарных наук,
профессор

Жестерев Виктор Иванович

Официальные оппоненты

доктор биологических наук,
профессор

Юрков Сергей Григорьевич

кандидат ветеринарных наук

Елаков Александр Леонидович

Ведущая организация

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ГНУ ВНИТИБП, г. Щелково)

Защита состоится **20 июня 2008 г.** в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук по адресу 601120, г. Покров Владимирской области, ГНУ ВНИИВВиМ Тел/факс (49243)62125

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института

Автореферат разослан « 13 » мая 2008 г

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук -



Савукова В Я

I Общая характеристика работы

Актуальность темы

Бешенство представляет большую угрозу здоровью животных и человека. Несмотря на достижения современной науки в изучении болезни, она имеет выраженную тенденцию к распространению. В России в период с 2000 по 2003 гг. наблюдался рост эпизоотии (Мавсесянц А.А., 2003, Хадарцев О.С., 2003). За шесть месяцев 2007 г. в 53 субъектах РФ зафиксировано 1788 неблагополучных по бешенству пунктов с подтверждением диагноза у 2289 животных. Количество случаев бешенства животных по сравнению с 2006 г. возросло в 2,1 раза (Рождественский И.К. и др., 2007). Степень риска эпизоотии напрямую зависит от численности диких плотоядных - лисиц, енотовидных собак, корсаков и др. Увеличивающееся количество безнадзорных собак и кошек повышает частоту их контактов с больными бешенством дикими плотоядными и передачу инфекции человеку (Макаров В.В., 2002, ФГУ «Центр ветеринарии», 2006). В 2001 г. в РФ за антирабической помощью в клиники Минздрава обратились 452281 человек, в 2002 г. – 470000 человек (Сазонкин В.Н., Семенова М.А., 2004).

В основу профилактических мероприятий против бешенства включают поголовную вакцинацию домашних, бродячих и диких животных, а также регулирование их численности (Хрипунов Е.М. и др., 2002, С.К. Димов и др., 2003, Artois M. et al., 2001). Для вакцинации домашних животных используют инактивированные вакцины, для диких плотоядных животных - только живые вирусвакцины, поэтому к штаммам предъявляют высокие требования по их безопасности. В связи с этим перечень их весьма ограничен. В России для приготовления антирабических вакцин используют штаммы «Внуково-32», «Щелково-51», «РВ-97», «ТС-80» (Селимов М.А., 1987, Сергеев В.А., 1993, Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001, Иванов В.С. и др., 2001, Жестерев В.И., Лаптева О.Г., 2004, Steck F. et al., 1980).

Во ВНИИВВиМ вакцинный штамм «71 БелНИИЭВ-ВГНКИ» (РБ-71) вируса бешенства был адаптирован к перевиваемой линии клеток почки сайги и

получил название «ВИРАБ-2001» (Сливко И А , 2003) Штамм имел высокие иммуногенные и антигенные свойства по сравнению со штаммом «ТС-80» В связи с остаточной патогенностью для лабораторных животных при интрацеребральном и периферических способах инокуляции штамм «ВИРАБ-2001» рекомендован для изготовления только инактивированных вакцин

На основании изложенного исследования по селекции штамма «РБ-71» вируса бешенства с целью снижения его нейрпатогенных свойств, сохранив при этом иммуногенные и антигенные, что позволило бы использование его как для инактивированного препарата, так и при конструировании вирусвакцины для пероральной вакцинации диких плотоядных, являются актуальными

Цель и задачи исследований

Цель – получение и паспортизация селекционированного штамма «РБ-71/10» вируса бешенства

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи

- провести селекцию штамма «РБ-71» вируса бешенства в культуре клеток при экстремальном пассировании,
- изучить нейрпатогенные свойства нового штамма «РБ-71/10» на лабораторных животных при интрацеребральном и экстраневральном введениях,
- разработать технологию выращивания штамма «РБ-71/10» вируса бешенства в культуре перевиваемых клеток,
- изучить иммунобиологические свойства нового штамма «РБ-71/10» вируса бешенства на животных разного вида,
- паспортизировать основные характеристики нового штамма вируса бешенства и дать рекомендации по его применению

Научная новизна результатов состоит

- в обосновании и экспериментальном подтверждении возможности получения нового вакцинного штамма «РБ-71/10» вируса бешенства при экстремальном пассировании предельными разведениями,

- в обоснованном комплексном подходе к изучению патогенных, патогномонических, иммунобиологических и других характеристик штамма «РБ-71/10» вируса бешенства,

- в разработке технологии культивирования штамма «РБ-71/10» вируса бешенства, пригодной для промышленного получения вирусного сырья,

- в подборе стабилизаторов для лиофилизации штамма «РБ-71/10» вируса бешенства и приготовлении пероральной вакцины

Практическая значимость работы

1 Получен новый вакцинный штамм «РБ-71/10» вируса бешенства, обладающий пониженной, по сравнению с исходным штаммом, нейрпатогенностью для лабораторных животных и сохранившего иммуногенные (антигенные) характеристики

2 Разработан и апробирован новый технологический подход к выращиванию вирусного сырья с использованием стационарного или роллерного культивирования в перевиваемой линии клеток почки сайги

3 Проведены паспортизация нового штамма «РБ-71/10» вируса бешенства в соответствии с требованиями ВОЗ (2003 г) и депонирование в музее штаммов микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (2007 г)

Основные положения, выносимые на защиту

- 1 Штамм «РБ-71/10» вируса бешенства, полученный путем экстремального пассирования предельными разведениями
- 2 Технология получения вирусного сырья (штамм «РБ-71/10») различными техническими методами в перевиваемых линиях клеток
- 3 Иммунобиологические характеристики штамма «РБ-71/10» вируса бешенства (нейрпатогенность, инвазивность, иммуногенность, антигенность, безвредность)
- 4 Паспортизация штамма «РБ-71/10» и рекомендации по его практическому использованию

Апробация и публикация результатов исследований

Основные положения диссертационной работы отражены в итоговых отчетах ГНУ ВНИИВВиМ за 2005-2007 гг по теме Россельхозакадемии 08 01 03 02 «Получение технологически перспективных штаммов вируса бешенства и разработка новых экологически безопасных средств специфической защиты сельскохозяйственных, домашних и диких животных» Материалы доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ (2005-2007 гг), а также на международных научно-практических конференциях (ВНИВИПФиТ, г Воронеж, 2006, ВНИТИБП, г Щелково, 2006, ФЦТРБ, г Казань, 2007) По теме диссертации опубликовано 5 статей, из них две в журнале Ветеринария (2006 и 2007 гг) и три в сборниках международных научно-практических конференций (2006 г, 2008 г) Результаты основных исследований подтверждены комиссионно (акт №10 от 17.10.2007 и акт №1 от 20.02.2008) Оформлен паспорт на вакцинный штамм «РБ-71/10» вируса бешенства (инв №2705)

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 96 страницах, иллюстрирована 3 рисунками, 21 таблицей и дополнена приложениями Список литературы включает 197 источников, из которых 133 – отечественные

Личный вклад

Основная часть диссертационной работы выполнена автором самостоятельно, личный вклад составляет не менее 70% При выполнении отдельных фрагментов работы оказывали методическую или консультативную помощь сотрудники лаборатории «Биология и культивирование вирусов» - к в н Лаптева О Г, к б н Горшкова Т Ф, к в н Зеленцов В А, отдела Биологического и технологического контроля - Глухарева Е Н и Малоголовкина Н В, лаборатории «Иммунология» - к б н Капустина О В, а также сотрудники лаборатории «Культуры клеток с музеем клеточных штаммов» и «Конструирование биопрепаратов», за что автор выражает им искреннюю благодарность

2 Собственные исследования

2.1. Материалы и методы

Вирус бешенства вакцинный штамм 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ (РБ-71), с инфекционной активностью $5,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ – инв №2013, вакцинный штамм ВИРАБ-2001 (дериват штамма РБ-71), 7 пассаж, от 07 02 2002, титр $6,5 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ – инв №2373, вакцинный штамм ТС-80, 78 пассаж в культуре клеток ПС, титр $7,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ - инв №1033, референс-штамм CVS, титр $6,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ - инв №1227 Все штаммы получены в музее микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ

Клеточные культуры почки сайги (ПС – катал № 31 1), почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/13 (мексиканская сублиния) - катал №39 3), перевиваемые клетки почки африканской зеленой мартышки (CV-1 – катал № 43 3 и 4647 – катал № 57) из коллекции клеточных культур ГНУ ВНИИВВиМ (Юрков С Г , 2000 г)

Животные аутбредные белые мыши (6-18 г), кролики массой 1,0-2,5 кг, морские свинки массой 250-350 г, беспородные овцы в возрасте 1,0-1,5 года и шенки 2-4 мес Кормление осуществляли в соответствии с рекомендованными рационами

Культивирование клеток и вируса бешенства (ВБ) проводили в стационарном и круговом пристеночном монослое, используя среду Игла-МЕМ с 2-5% сыворотки крови КРС или без сыворотки, или в суспензии в среде 0,25% ферментативного гидролизата мышц КРС (ФГМ-С) на солевом растворе Эрла без солей Ca^{2+} с двойным набором витаминов группы В и добавлением глутамина (0,6 г/л)

Инфекционную активность ВБ определяли на белых мышах и выражали в МЛД₅₀ или в культуре клеток ПС по реакции МФА и выражали в ККИД₅₀ Расчет дозы вируса проводили по методу Рида и Менча (Троценко Н И и др , 1989, Reed L J , Muench H A , 1938, Kaplan M M , 1975)

Инвазивность Индекс инвазивности штаммов ВБ оценивали заражением мышей массой 10-12 г различными методами и рассчитывали его по методике Джмухадзе В А , Сафарова Р К , 1981, Сливко И А , 2003

Оценку иммуногенных свойств вируса бешенства проводили на морских свинках, кроликах, овцах и собаках На 21 сутки после иммунизации вакцинами определяли титры вируснейтрализующих антител (ВНА) и/или проводили контрольное заражение референс-штаммом «CVS» в дозе 50-70 ЛД₅₀

Статистическая обработка результатов Эксперименты проводили с числом повторностей не менее 3-х, обеспечивающим получение достоверных результатов Цифровые данные обрабатывали методом наименьших квадратов, рассчитывали средние арифметические значения и их средние квадратичные отклонения (Ашмарин И П , Воробьев А А , 1962)

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Селекция штамма

Селекцию штамма «РБ-71» ВБ осуществляли в перевиваемой линии клеток ПС Первоначально провели адаптацию вируса штамма «РБ-71» к культуре клеток ПС На уровне 4-го пассажа штамм «РБ-71» накапливался в титре 4,5 Ig МЛД₅₀/см³ При последующем пассировании (множественность заражения (МЗ) 0,05 МЛД₅₀/кл) титры вируса повысились к 12 пассажу до 7,0-7,2 Ig МЛД₅₀/см³ Дальнейшее культивирование проводили с использованием различных разведений вирусного инокулята Время выращивания составляло 3-7 суток при 37°C и зависело от использованного разведения инокулята и уровня пассажей При МЗ 0,005-0,0005 удлинялся период инкубирования вируса Результаты 15 последовательных пассажей приведены в табл 1

При дозах инфицирования клеток ПС 0,05 и 0,005 МЛД₅₀/кл с 1-го пассажа проявлялось ЦПД вируса и к 15 пассажу титр составлял 7,25±0,25 Ig МЛД₅₀/см³ Снижение заражающей дозы инокулята в 10 и 100 раз приводило значительному уменьшению титров К 10 пассажу при МЗ 0,0005 МЛД₅₀/кл титр вируса составлял 6,25±0,20 Ig МЛД₅₀/см³, а к 15-ому - 4,20±0,15 Ig

МЛД₅₀/см³ При этом в первых 3-х пассажах отмечали слабовыраженное изменение инфицированного монослоя

Таблица 1
Влияние множественности заражения на инфекционную активность штамма «РБ-71» вируса бешенства в культуре клеток ПС

Множественность заражения, МЛД ₅₀ /кл	Селективные пассажи, титр вируса в lg МЛД ₅₀ /см ³		
	5 пассаж	10 пассаж	15 пассаж
0,05	7,10±0,20	7,37±0,13	7,25±0,25
0,005	7,00±0,12	6,50±0,06	не исследовали
0,0005	6,00±0,01	6,25±0,20	4,20±0,15

n=3

Полученный селективными пассажирами вирус 10-го пассажа («РБ-71/10») при технологических режимах культивирования (МЗ - 0,5-0,05 МЛД₅₀/кл, среда Игла-МЕМ с 5% сыворотки КРС, 5 суток выращивания, 37°C) стабильно накапливался в культуре клеток ПС в титрах 6,5-7,1 lg МЛД₅₀/см³ на протяжении 5 пассажей В клетках ВНК-21/13 титр вируса был на порядок ниже (5,8 lg МЛД₅₀/см³) В клетках зеленой мартышки (4647, CV-1) к 5-ому пассажиру вирус не обнаруживали

Таким образом, предельными разведениями получен новый вариант штамма «РБ-71» ВБ, который условно обозначили как «РБ-71/10» Этот штамм был взят для дальнейшего изучения его иммунобиологических характеристик

2 2 2 Патогномические свойства штаммов вируса бешенства для лабораторных животных

Задачей исследования являлась оценка нейропатогенных, инвазивных, антигенных и иммуногенных свойств штамма «РБ-71/10»

2 2 2 1 Патогенность для лабораторных животных

Нейропатогенные свойства штамма «РБ-71/10» ВБ определяли на белых мышах, кроликах, морских свинках при интрацеребральном (и/ц), внутримышечном (в/м) и подкожном (п/к) введениях За инфицированными животными наблюдали в течение 21-30 суток

Патогенность для мышей штамма «РБ-71/10» изучали в сравнении со штаммами «ТС-80» и «ВИРАБ-2001»

Мыши, зараженные и/ц, заболевали на 3-5 сутки после введения штаммов «РБ-71/10» и «ВИРАБ-2001», на 8-17 сутки после введения штамма «ТС-80» Гибель мышей наступала в течение 24-36 ч При п/к и в/м заражениях инкубационный период и длительность болезни увеличивались на 2-3 суток

Независимо от использованного штамма ВБ и при равных дозах вируса белые мыши сохраняли 100% чувствительность к и/ц заражению Штамм «ВИРАБ-2001» вызывал также гибель всех мышей после п/к и в/м введения в дозе 3,0 - 6,5 Ig МЛД₅₀ При аналогичном введении штамма «РБ-71/10» в дозе 5,5 - 6,5 Ig МЛД₅₀ наблюдали снижение патогенности для мышей (гибель достигала 76-84%) После в/м и п/к инокуляции штамма «ТС-80» гибель мышей составляла 26,6% и 20% соответственно

Патогенность для кроликов Кролики, зараженные и/ц штаммом «РБ-71/10» в дозе 4,5 Ig МЛД₅₀ погибали на 5-6-е сутки с характерными признаками бешенства (парезы, параличи) Длительность болезни составляла 2 суток После в/м инфицирования из 15 кроликов заболели 2 на 7 и 9 сутки Инкубационный период и длительность болезни имели затяжной характер (до 6 суток) с последующей гибелью животных При п/к инокуляции штамма не отмечали отклонений в клиническом состоянии кроликов на протяжении 21-30 суток

Штамм «ВИРАБ-2001» при в/м введении кроликам в дозе 6,25 Ig МЛД₅₀ вызывал паралитическую форму бешенства с гибелью одного из 2-х животных на восьмые сутки После п/к введения кролики не заболевали в течение всего срока наблюдения (21 сутки)

Патогенность для морских свинок Морские свинки после и/ц заражения штаммом «РБ-71/10» в дозе 4,3 Ig МЛД₅₀ заболевали на 4 сутки Болезнь развивалась с характерными клиническими признаками и последующей (через 18-24 ч) гибелью всех животных данной группы После в/м введения вируса в дозе 5,2-6,0 Ig МЛД₅₀ 2 свинки из 15 (13%) заболели на 6 - 9 сутки наблюдения У заболевших животных наблюдали нарушение координации движения, болевую

чувствительность мышц поясничного отдела, увеличение частоты дыхания. Через 24-36 ч наступал паралич каудальной части тела, через 48-72 ч животные погибали. При патологоанатомическом вскрытии павших животных отмечали отечность и гиперемию головного мозга и мозговых оболочек. У незаболевших животных каких-либо изменений не обнаружили.

После п/к введения ВБ все животные оставались клинически здоровыми в течение всего периода наблюдения.

2.2.2.2 Индикация вируса в тканях

Уровень накопления вируса в головном мозге лабораторных животных после и/ц, п/к и в/м заражения определяли титрованием 10%-ных суспензий материалов на белых мышах по общепринятой методике (табл. 2).

Таблица 2

Индикация штамма «РБ-71/10» вируса бешенства в головном мозге лабораторных животных

n=3

Метод введения	Клинические признаки	Титр вируса (lg МЛД ₅₀ /см ³) в головном мозге животных		
		мыши	кролики	морские свинки
и/ц	паралитическая форма бешенства	7,00±0,05	5,00±0,10	7,00±0,20
в/м	паралитическая форма бешенства	5,70±0,15	н/у	6,00±0,05
	клинически здоровые	н/у	н/у	н/у
п/к	паралитическая форма бешенства	6,10±0,25	н/у	н/у
	клинически здоровые	н/у	н/у	н/у

Примечание: н/у – не установлено.

Как правило, ВБ выявляли в головном мозге только больных животных. После и/ц введения вирус накапливался в головном мозге мышей и морских свинок в титрах 7,0 lg МЛД₅₀/см³, у кроликов – 5,0 lg МЛД₅₀/см³. При в/м инфицировании титры вируса в мозговой ткани морских свинок и мышей были на один порядок ниже. При и/ц инокуляции кроликам вирус обнаруживали в пробах селезенки (1,9 lg МЛД₅₀/г). В печени и лимфатических узлах при и/ц инокуляции, а также во всех исследуемых органах при п/к и в/м введениях инфицированного материала вирус не был обнаружен.

2 2 2 3 Цитоморфологические исследования

Для гистологического исследования от кроликов, инфицированных штаммом «РБ-71/10», отбирали различные участки головного мозга (аммонов рог, кора больших полушарий, продолговатый мозг, мозжечок) и готовили гистосрезы по методу Муромцева и Селлерса (Лилли Р, 1969, Большая Медицинская Энциклопедия, 1976, Kaplan М М, 1975)

При микроскопии срезов головного мозга кроликов, зараженных и/ц, выявляли признаки воспаления, более выраженные в аммоновых рогах, продолговатом мозге. В периваскулярных пространствах обнаруживали скопления лимфоидных клеток, периваскулярные и перицеллюлярные отеки, пикноз и полихроматоз нервных клеток. Регистрировали полнокровие, расширение просвета сосудов, набухание, очаговые кровоизлияния.

В некоторых препаратах головного мозга кроликов, павших после в/м введения вируса отмечали наличие периваскулярного отека и инфильтрацию ткани головного мозга клетками лимфоидного типа. При п/к инокуляции вируса каких-либо изменений в тканях не выявляли.

2 2 2 4 Инвазивность

Индекс инвазивности штаммов «РБ-71/10», «ВИРАБ-2001» и «ТС-80» ВБ определяли на белых мышах по разности титров вируса при и/ц и периферических методах введения (табл. 3)

Таблица 3

Штамм вируса	Инвазивность вируса бешенства			Индекс инвазивности
	Титр вируса (lg МЛД ₅₀ /см ₃) при различных методах введения			
	и/ц	в/м	п/к	
ВИРАБ-2001	7,0	4,3	3,2	2,7 - 3,8
РБ-71/10	6,7	1,7	1,3	5,0 - 5,4
ТС-80	6,3	1,3	0,3	5,0 - 6,0

Как показали опыты, индекс инвазивности штаммов «РБ-71/10» и «ТС-80» находился в пределах 5,0-6,0, что позволяет отнести их к группе слабови-

рулентных (индекс инвазивности больше 4), а «ВИРАБ-2001» с индексом инвазивности 2,7-3,8 - к средневирulentным штаммам

Таким образом, представленные исследования показали, что полученный штамм «РБ-71/10» значительно снизил свою патогенность для лабораторных животных и относится к слабовирulentной группе. По совокупности оцененных признаков – сниженной нейропатогенности, индексу инвазивности, результатам п/к введения – штамм «РБ-71/10» соответствует требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам ВБ.

2.2.3. Генетические маркеры штамма «РБ-71/10»

Одним из методов оценки штамма, как вакцинного, является его репродукция при различных температурах (гст-признак) (Гендон Ю З, 1967, Lwoff, A, Lwoff, M, 1961). В наших опытах изучали накопление штаммов «РБ-71» и его деривата «РБ-71/10» ВБ в культуре клеток ПС при 33, 37 и 41°C (табл. 4). Длительность культивирования определяли по интенсивности поражения монослоя вирусом (ЦПД 70-80%).

Таблица 4
Репродукции вируса бешенства в культуре клеток ПС при различных температурах

n=3

Штамм вируса	Заражение на монослой				Заражение в суспензию		
	Температура (°C)	Доза заражения Ig МЛД ₅₀ /кл	Длительность выращивания (сутки)	Титр вируса Ig МЛД ₅₀ /см ³	Доза заражения Ig МЛД ₅₀ /кл	Длительность выращивания (сутки)	Титр вируса Ig МЛД ₅₀ /см ³
РБ-71	+33	0,5	5-6	7,40±0,28	0,2-0,3	5-6	7,3±0,15
	+37	-/-	5	7,55±0,09	-/-	5	7,5±0,10
	+41	-/-	4	4,90±0,60	-/-	4	5,0±0,20
РБ-71/10	+33	0,5	5-6	7,30±0,50	не исследовали		
	+37	-/-	5	7,50±0,28			
	+41	-/-	4	4,80±0,31			

Штаммы «РБ-71» и «РБ-71/10» ВБ максимально накапливались в культуре клеток ПС при 37°C (гст₃₇⁺) и 33°C (гст₃₃⁺). Репродукция вируса была приблизительно одинаковой (7,3-7,5 Ig МЛД₅₀/см³) и существенно не различалась

при инокуляции на монослой или в суспензию клеток. При температуре 41°C отмечали уменьшение накопления вируса на 2-3 порядка (сct_{41}). Инфекционная активность обоих штаммов находилась в пределах 4,8-4,9 lg МЛД₅₀/см³. Длительность выращивания вируса при 37°C составляла 5 суток. При 33°C время культивирования увеличивалось в среднем на 1 сутки, а при 41°C снижалось на сутки.

При 33°C клеточный пласт не разрушался в течение всего периода культивирования. При 37°C наблюдали полное поражение монослоя (CC⁺ - признак) вирусом на 5-е сутки инкубирования. Температура 41°C оказывала негативное действие на морфологию клеток (увеличение в размерах, нечеткость границ, зернистость цитоплазмы). На 4-е сутки выращивания монослой частично разрушался за счет дегенерации клеток и отслоения их от субстрата, ЦПД отсутствовало.

Патогенность штамма «РБ-71/10» ВБ для мышей, кроликов и морских свинок позволила оценить фенотипический признак - Р-признак, а морфологические изменения центральной нервной системы кроликов MR-признак.

Штаммы «РБ-71/10», «ВИРАБ-2001» и «ТС-80» патогенны для мышей при и/ц инокуляции - Рm_c⁺. При в/м заражении штаммом «РБ-71/10» отмечали остаточную нейропатогенность для кроликов - PR_{im}[±] и морских свинок Pgh_{im}[±]. При гистологическом исследовании в некоторых препаратах головного мозга кроликов наблюдали периваскулярный отек и инфильтрацию ткани головного мозга клетками лимфоидного типа - MR_{im}[±]. Кролики и морские свинки, которым вирус инокулировали п/к, в течение 28-30 суток оставались клинически здоровыми - PR_{sc}⁻, Pgh_{sc}⁻. В препаратах разных отделов головного мозга кроликов каких-либо изменений не обнаружили - MR_{sc}⁻.

2.2.4 Иммунобиологические характеристики

2.2.4.1 Антигенные свойства штаммов «РБ-71/10» и «ВИРАБ-2001» ВБ оценивали по титру антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) с помощью реакции нейтрализации (РН). Делали 2-кратные разведения стандартной и исследуемых сывороток на фосфатно-солевом буфере. Доза вируса

штамма «РБ-71/10» составляла 100-150 ККИД₅₀ Титры рассчитывали по методу Кербера и выражали в МЕ/см³ (международные единицы)

Как показали опыты, на 14 сутки после вакцинации штаммом «РБ-71/10» в дозе 5,25 Ig МЛД₅₀ титр антител у морских свинок независимо от метода введения превышал требуемый уровень защиты (0,5 МЕ/см³) более чем в 2 раза В дальнейшем отмечали нарастание титров антирабических ВНА, которые при п/к введении достигли максимума 4,46±0,01 МЕ/см³ к 21 суткам, а при в/м введении - 1,40±0,02 МЕ/см³ - к 27 суткам

В сыворотках крови кроликов через 21 сутки после инфицирования штаммом «РБ-71/10» в дозе 6,25-7,00 Ig МЛД₅₀ титры ВНА составляли 2,23 - 3,65 МЕ/см³ после п/к введения и 3,15 - 4,45 МЕ/см³ после в/м

Параллельные испытания штамма «ВИРАБ-2001» показали практически сравнимые результаты по индукции рабических ВНА у кроликов после в/м инокуляции

2 2 4 2 Иммуногенные свойства антирабической вирусвакцины из штамма «РБ-71/10» определяли по методу Н Корговски (1975) в соответствии с рекомендациями ВОЗ

Морских свинок (5 голов) вакцинировали в/м штаммом «РБ-71/10» в дозе 5,25 Ig МЛД₅₀ и кроликов (по 6 голов) в/м и п/к в дозе 6,25 Ig МЛД₅₀ Через 21-25 суток контрольным и иммунизированным животным вводили в/м морским свинкам и и/ц кроликам референс-штамм «CVS» ВВ в дозе 50-70 ЛД₅₀

Как показали исследования, после контрольного заражения невакцинированные животные пали на 5-10 сутки с характерными признаками бешенства (нарушение координации движений, параличи) Привитые животные оставались клинически здоровыми (100% защита) на протяжении всего периода наблюдения Независимо от метода введения (п/к, в/м) вакцинного штамма «РБ-71/10» титры ВНА находились в пределах 3,0-4,5 МЕ/см³ и превосходили необходимый защитный уровень (0,5 МЕ/см³) в 6-9 раз

Учитывая полученные результаты, целесообразно было оценить безвредность штамма «РБ-71/10» и используемого в практике штамма «ТС-80» на бес-

породных овцах Исследования показали, что штаммы «РБ-71/10» и «ТС-80» в дозах 6,5-7,0 lg МЛД₅₀ безвредны для овец и не вызывали у них каких-либо клинических отклонений за весь период наблюдения

На 21 сутки после в/м инокуляции штамма «РБ-71/10» у овец выявляли ВНА в титрах 1 32 – 1 40, в то время как после введения штамма «ТС-80» титры ВНА находились в пределах 1 2,0 – 1 2,5, что указывает на то, что штамм «РБ-71/10» более иммуногенен по сравнению со штаммом «ТС-80»

Таким образом, полученный штамм «РБ-71/10» вызывает образование антирабических ВНА в достаточно высоких титрах, превышающих требуемые нормы (рекомендации ВОЗ) и защищает всех привитых лабораторных животных от заражения референс-штаммом «CVS» ВБ

2.2 5. Разработка технологии выращивания вируса

2 2 5 1 Стационарный метод культивирования

Метод разового выращивания Штамм «РБ-71/10» ВБ пассировали в стационарном монослое клеток ПС при 37°С Инфицирование клеток осуществляли как при посеве на матрасы (во взвесь), так и на сформировавшийся (80-90%) монослой При этом МЗ составляла 0,1-0,3 и 0,01-0,03 МЛД₅₀/кл соответственно Клетки выращивали в среде Игла-МЕМ с 5% сыворотки крови КРС При культивировании вируса использовали аналогичную среду с 5, 2 и 0% сыворотки (табл 5) Длительность культивирования 4-6 суток

Таблица 5

Культивирование штамма «РБ-71/10» вируса бешенства
в стационарной культуре клеток ПС

Множественность заражения (МЛД ₅₀ /кл)	Титр вируса (lg МЛД ₅₀ /см ³) при заражении			
	во взвесь клеток	на монослой (процент сыворотки)		
		5%	2%	0%
0,1 – 0,3	6,75±0,25	7,15±0,20	не исследовали	не исследовали
0,01 – 0,03	7,00±0,25	7,00±0,25	6,80±0,18	6,08±0,35

n=3

Не наблюдали существенной разницы в накоплении вируса при МЗ 0,03-0,1 МЛД₅₀/кл при различных условиях культивирования (внесение вируса в момент посадки клеток на субстрат или на сформировавшийся монослой и содержание 5% и 2% сыворотки в поддерживающей среде) Отсутствие сыворотки КРС в среде приводило к снижению титра вируса (на 1,0 lg МЛД₅₀/см³)

Следует отметить, что при дозе заражения 0,01-0,03 МЛД₅₀/кл на третьи сутки после инокуляции вируса наблюдали появление в монослое ЦПД При увеличении МЗ до 0,1-0,3 МЛД₅₀/кл ЦПД вируса появлялись уже на 2 сутки В последующие сроки культивирования нарастали деструктивные изменения В культуре, не содержащей сыворотку КРС, процесс деструкции клеточного монослоя происходил гораздо быстрее Заражение во взвесь клеток не вызывало полной деструкции монослоя клеток в течение 6 суток

При выбранных режимах выращивания (МЗ - 0,01-0,03 МЛД₅₀/кл, внесение вируса во взвесь клеток или на монослой, среда Игла-МЕМ с 5% сыворотки крови КРС, 5 суток выращивания при 37°C) штамм «РБ-71/10» стабильно накапливался в титрах 6,75 – 7,15 lg МЛД₅₀/см³ в течение 7 последовательных пассажей при содержании 5% сыворотки крови КРС в среде

Метод периодической смены среды Учитывая, что интактная культура клеток ПС сохраняется без смены среды в течение 30 дней (Юрков С Г , 2000), нами применен метод периодического слива вируссодержащей жидкости для штаммов «ТС-80», «РБ-71», «РБ-71/10» с использованием этих клеток

Инфицировали 1-2-х суточный монослой клеток ПС (80-90%) вирусом бешенства (штаммы «ТС-80», «РБ-71», «РБ-71/10») из расчета 0,5 - 0,01 МЛД₅₀/кл Зараженную культуру выдерживали 9-15 суток, проводя каждые 3 суток смену инфицированной среды на свежую аналогичного состава (табл 6)

Дегенеративные изменения появлялись на третьи сутки после заражения ВВ штаммом «РБ-71/10» При выращивании штаммов «ТС-80» и «РБ-71» ЦПД обнаруживали на 4-6 сутки культивирования В большей степени они проявлялись при МЗ 0,01 МЛД₅₀/кл При репродукции штаммов «РБ-71» и «РБ-71/10»

площадь цитопатического поражения культуры больше, чем при использовании штамма «ТС-80»

Таблица 6

Репродукция вируса бешенства в стационарной культуре клеток ПС при периодической смене (сливах) среды

n=3

Штамм вируса	Доза заражения МЛД ₅₀ /кл	Номер слива / Возраст культуры (сутки) (титр lg МЛД ₅₀ /см ³)			
		1 / 3	2 / 6	3 / 9	5 / 15
ТС-80	0,5	5,9±0,01	6,5±0,26	6,0±0,25	4,8±0,10
РБ-71	0,5	5,5±0,15	8,0±0,03	6,0±0,07	4,5±0,15
	0,01	4,8±0,14	6,8±0,32	7,0±0,08	6,5±0,20
РБ-71/10	0,5	7,0±0,30	8,2±0,50	6,5±0,25	н/и
	0,01	7,0±0,22	8,0±0,20	6,7±0,05	н/и

Примечание н/и – не исследовали

Независимо от использованного штамма максимальное накопление вируса отмечали во вторых сливах (на 6 сутки) При МЗ 0,5 МЛД₅₀/кл для штамма «ТС-80» титр составлял 6,5±0,26 lg МЛД₅₀/см³, для штамма «РБ-71» - 8,0±0,03 lg МЛД₅₀/см³, для штамма «РБ-71/10» - 8,2±0,50 lg МЛД₅₀/см³ При последующей смене среды наблюдали постепенное снижение титров вируса и на уровне 5 слива (15 суток) они были в пределах активности первоначальных инокулятов. Инфекционная активность объединенных материалов 1, 2 и 3-его сливов составила для штамма «ТС-80» 6,1 lg МЛД₅₀/см³, «РБ-71» - 6,2-6,5 lg МЛД₅₀/см³ и «РБ-71/10» - 7,25 lg МЛД₅₀/см³. Снижение дозы заражения в 50 раз не оказывала существенного влияния на уровень накопления штамма «РБ-71/10», а для штамма «РБ-71» титры были на 1,0 lg МЛД₅₀/см³ ниже.

Таким образом, метод периодической смены инфицированной среды позволяет от одной монослойной культуры-продуцента получать 2-х и 3-х кратный объем вирусного материала штамма «РБ-71/10» с высокой инфекционной активностью (7,25 lg МЛД₅₀/см³)

2 2 5 2 Роллерный метод культивирования

Культивирование штамма «РБ-71/10» ВБ в круговом пристеночном моно слое клеток ПС в роллерных бутылках проводили при использовании среды Игла-МЕМ с 2 и 5% сыворотки крови КРС. Время культивирования вируса составляло 5 суток при 37°C (табл. 7)

Таблица 7

Культивирование штамма «РБ-71/10» вируса бешенства
в круговом моно слое клеток ПС

n=3

Множественность заражения	Содержание сыворотки (в %)	Титр вируса (lg МЛД ₅₀ /см ³) при заражении		
		во взвесь клеток	на моно слое	
			односуточный	двухсуточный
0,01-0,03	5	7,30±0,15	7,20±0,30	6,87±0,13
	2	н/и	6,77±0,16	6,65±0,35

Примечание: н/и – не исследовали

Результаты исследования показали, что заражение культуры клеток ПС вирусом в дозе 0,01-0,03 МЛД₅₀/кл одновременно с их посадкой в культуральные сосуды (во взвесь) или на односуточный моно слой и содержания в среде 5% сыворотки КРС являются оптимальными. При этих режимах титры вируса на 0,3-0,5 lg МЛД₅₀/см³ выше полученных как на двухсуточном моно слое, так и при уменьшении сыворотки в поддерживающей среде до 2%

2 2 5 3 Суспензионный метод культивирования

Учитывая достаточно хорошую чувствительность клеток ВНК-21/13 к ВБ (Гочмурадов М.Г., 1999, Иванов В.С., 2001, Красуткин С.Н., 2002) в наших опытах оценивали репродукцию штамма «РБ-71/10» в суспензионной линии клеток ВНК-21/13 (мексиканская сублиния). Клетки выращивали во взвеси в среде 0,25% ФГМ-суспензионной (Лаптева О.Г., 2003). Вирус с исходной активностью 7,0 lg МЛД₅₀/см³ вносили в дозах 1,0, 0,1 и 0,01 МЛД₅₀/кл в посевную клеточную суспензию (450-500×10³ кл/см³). Определяли влияние МЗ на пролиферативную способность клеток и их жизнеспособность при культивиро-

вании и накопление вируса. Наблюдение проводили как за интактными, так и инфицированными клетками.

Максимальную концентрацию клеток $(3,4 - 4,6) \times 10^6/\text{см}^3$ в интактной культуре наблюдали на 3-4 сутки культивирования. В инфицированной суспензии максимальный прирост клеток и длительность культивирования находились в прямой зависимости от МЗ. Чем меньше МЗ (0,1-0,01 МЛД₅₀/кл), тем выше прирост клеток в суспензии $((3,00-3,48) \times 10^6/\text{см}^3)$ на 2-3 сутки. В дальнейшем (на 4-6 сутки) наблюдали снижение плотности клеточной суспензии и потерю жизнеспособности (ниже 33%). При максимальной МЗ (1,0 Ig МЛД₅₀/кл) 25-30% жизнеспособных клеток оставалось на 5 сутки культивирования, при уменьшении дозы вируса процесс культивирования удлинялся на сутки. Наибольшее накопление штамма «РБ-71/10» $(6,2 \pm 0,2 \text{ Ig МЛД}_{50}/\text{см}^3)$ отмечали при МЗ 1,0 МЛД₅₀/кл через 5 суток культивирования. При уменьшении МЗ жизнеспособность клеток снижалась к 6 суткам, а титр вируса был в пределах 5,0-5,5 Ig МЛД₅₀/см³.

Несмотря на использование обогащенной питательной среды ФГМ-суспензионной, а также 4-7-ми кратный прирост инфицированных клеток ВНК-21/13 во взвеси, убедительного накопления ВБ получить не удалось.

Таким образом, разработана технология выращивания ВБ штамма «РБ-71/10» в стационарном и роллерном монослое клеток ПС, при которой можно получать вирусное сырье с активностью в пределах 7,0-7,5 Ig МЛД₅₀/см³. При выращивании вируса в суспензии не было получено ожидаемых результатов (титр 5,3-6,2 Ig МЛД₅₀/см³), несмотря на хорошую пролиферацию клеток во взвеси.

Предложен усовершенствованный метод получения вирусного сырья с помощью периодических сливов инфицированной культуральной жидкости, что позволяло получать трехкратные объемы вирусного материала со средней инфекционной активностью 7,25 Ig МЛД₅₀/см³ $(7,0-8,2 \text{ Ig МЛД}_{50}/\text{см}^3)$.

2.2.6. Приготовление экспериментальных образцов вирусвакцины

2 2 6 1 Подбор стабилизаторов

Во ВНИИВВиМ лиофилизацию антирабической вирусвакцины из штамма «ТС-80» проводили, используя стабилизирующую среду, содержащую в конечных концентрациях 5% пептон, 10% лактозы, 1% желатина (Сливко И А , 2003), при этом отмечали потерю активности до $1,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ При подборе защитных сред, оценку качества препаратов из штамма «РБ-71/10», высушенных с различными стабилизаторами, проводили по внешнему виду таблетки (макровид), растворимости и биологической активности вирусного материала (табл 8)

Таблица 8

Характеристика экспериментальных лиофилизированных образцов вирусвакцины из штамма «РБ-71/10» вируса бешенства

№	Состав защитных сред, (% масс)	Макровид	Растворимость, с	Титр вируса после высушивания, $\text{lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$
1	лактальбумин 2%	нестандарт	менее 1	$5,50 \pm 0,10$
2	пептон 8%, сорбит 2%, желатин 1%	стандарт	-//-	$6,75 \pm 0,15$
3	пептон 5%, лактоза 10%, желатин 1%	стандарт	-//-	$5,93 \pm 0,32$
4	пептон 2,5%, лактоза 5%, желатин 1%	нестандарт	-//-	$5,81 \pm 0,19$

n=3

Примечание титр вируса до высушивания $7,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$

Результаты показали, что со стабилизаторами №1 и №4 таблетка была нестандартной (неоднородная, вспененная), а потери титров вируса составили $1,0-1,5 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ Стандартная среда №3, также не предохраняла вирусный материал от значительных потерь ($1,0 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$), при сохранении макровида Только при использовании защитной среды №2 (пептон, сорбит, желатин) отмечали высокую сохранность вируса при сублимации Потеря инфекционной активности была в пределах $0,25 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ Независимо от состава используемых сред все лиофилизированные образцы штамма имели хорошую растворимость

Были приготовлены четыре образца пероральной вакцины из штамма «РБ-71/10» в форме приманки-брикета из хлебопекарной муки с разными стабилизаторами. Контролем служил рекомендуемый ранее стабилизатор, состоящий из пептона, лактозы и пектина (Исакова Н В, Евсеева С Д, Хрипунов Е М и др., 1997, 1999, 2004).

В наибольших титрах вирус сохранялся (табл. 9) при использовании среды, содержащей пептон, сахарозу и пектин (потеря титра $1,0 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$). Снижение титра на $1,5 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ получено для среды с пептоном, сорбитом и пектином. Среда №3, используемая в пероральной вакцине из штамма «ТС-80», и среда №4 не обеспечивали должную сохранность вируса, потери составляли до $2,0 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Таблица 9

Влияние состава защитных сред на сохранность штамма «РБ-71/10» вируса бешенства в вакцине-приманке

n=3

№	Состав защитных сред, (% масс)	Титр вируса, $\lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$	
		до высушивания	после высушивания
1	пептон 4%, сорбит 2%, пектин 0,2%	7,0 - 7,2	$5,5 \pm 0,10$
2	пептон 4%, сахароза 0,8%, пектин 0,2%		$6,0 \pm 0,05$
3	пептон 4%, лактоза 0,8%, пектин 0,2%		$5,2 \pm 0,25$
4	пептон 4%, лактоза 0,8%, желатин 0,5%, пектин 0,2%		$5,0 \pm 0,19$

2.2.6.2 Хранение вирусвакцины и вакцины для перорального применения
проводили при минусовой (-40°C) и плюсовых ($2-8^\circ\text{C}$ и $20-25^\circ\text{C}$) температурах.

Лиофилизированные материалы (стабилизаторы - пептон, сорбит, желатин и пептон, лактоза, желатин) хорошо сохранялись при минус 40°C и плюс $2-8^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев (срок наблюдения). Потеря титра вируса была менее $1,0 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Хранение образцов пероральной вакцины (стабилизатор - пептон, сахароза, пектин) при $20-25^\circ\text{C}$ приводило к снижению титра вируса до $1,0 \lg$

МЛД₅₀/см³ через 7-10 суток При температуре бытового холодильника вирус в вакцине-приманке сохранялся не менее 5 месяцев (срок наблюдения)

2 2 6 3 Оценка безвредности и иммуногенности

Вакцину-приманку (титр вируса 10⁶ МЛД₅₀/приманку) из штамма «РБ-71/10» и штамма «ТС-80» скармливали собакам (по 2 головы на штамм) Для оценки безвредности вакцины скармливали 10-ти кратную дозу вакцины (10 приманок на голову) Наблюдение за животными вели в течение 3 месяцев Отбор проб крови проводили на 30 и 60 сутки после вакцинации

Защитный уровень антител (более 0,5 МЕ/см³) отмечали к 60 суткам после вакцинации Иммуногенность пероральной вакцины на основе штамма «РБ-71/10» и «ТС-80» была одинаковой и составила 0,68 МЕ/см³ У животных, получивших 10 кратную дозу вакцины, титр ВНА находился на уровне 0,85 МЕ/см³

Таким образом, вакцина для перорального применения из штамма «РБ-71/10» оказалась безвредной и иммуногенной для собак

Выводы

1 Получен новый штамм «РБ-71/10» вируса бешенства пассированием исходного штамма «РБ-71» предельными разведениями в перевиваемой линии клеток почки сайги

2 Штамм «РБ-71/10» вируса бешенства обладает сниженной нейрпатогенностью для лабораторных животных при экстраневральной инокуляции и по индексу инвазивности (5,0-5,4) относится к слабовирулентным штаммам

3 По степени репродукции при пониженной (rct_{33}^+) и супраоптимальной (rct_{41}^-) температурах, отсутствию нейрпатогенных и патогномонических проявлений при подкожной инокуляции лабораторным животным штамм «РБ-71/10» пригоден к использованию в качестве вирусвакцины

4 Разработана технология выращивания штамма «РБ-71/10» в стационарном и роллерном монослое клеток ПС, позволяющая получать вирусное сырье с активностью 7,0-7,5 Ig МЛД₅₀/см³ при 37°C, дозе заражения 0,01-0,03

МЛД₅₀/кл во взвесь клеток, на одно- или двухсуточный монослой в среде Игла-МЕМ с 5% сыворотки крови КРС

5 Усовершенствована технология стационарного выращивания вируса, позволяющая методом многократных сливов инфицированной среды каждые 3 суток, получать вирусное сырье с активностью 6,5-8,2 (Σ 7,25) Ig МЛД₅₀/см³

6 Определены антигенные и иммуногенные свойства штамма «РБ-71/10» на лабораторных животных Вирус в дозе 5,25-6,50 Ig МЛД₅₀ индуцировал образование ВН-антител в титрах 1,0-4,5 ME/см³ и защищал всех вакцинированных лабораторных животных от контрольного заражения при 100% гибели в контроле

7 Оценена иммуногенность экспериментальных образцов вирусвакцины для перорального применения на собаках Индукция ВН-антител (0,68 ME/см³) позволяет рассчитывать на устойчивость вакцинированных животных к контрольному заражению (защитный уровень равен 0,5 ME/см³)

Практические предложения

1 Предложен для практического использования новый вакцинный штамм РБ-71/10 вируса бешенства Штамм не патогенен для животных при экстраневральном введении и сохраняет иммуногенные и технологические характеристики

2 Предложен высокотехнологичный метод выращивания вируса в стационарной культуре почки сайги с периодической сменой инфицированной среды, позволяющий не менее чем в 3 раза увеличить объем получаемого вирусного сырья с одной единицы культуры клеток

3 Штамм паспортизирован и депонирован в коллекцию микроорганизмов ВНИИВВиМ и может использоваться как при выполнении НИР, так и в производстве биопрепаратов

4 Полученные результаты по изучению патогномических, иммунобиологических и технологических характеристик штамма РБ-71/10 вируса бешенства вошли составной частью в проект СТО на штамм

Список опубликованных работ по материалам диссертации

1 Патоморфологические изменения у животных при введении фиксированного вируса бешенства / М А Ашенкова, В А Зеленцов, О Г Лаптева, О В Капустина // Актуальные проблемы ветеринарной патологии и морфологии животных Материалы Междунар науч -произв конф , посвящ 100-летию со дня рождения проф А А Авророва 22-23 июня 2006 г - Воронеж, 2006 -С 257-259

2 Патогномология и инвазивность штамма РБ-71/10 вируса бешенства при различных методах инокуляции лабораторным животным / О Г Лаптева, М А Ашенкова, В А Зеленцов, Н В Малоголовкина, Е Н Глухарева // Ветеринария - 2006 - №12 – С 26 – 28

3 Технологические параметры выращивания вируса бешенства / М А Филатова, В И Жестерев, О Г Лаптева, Т Ф Горшкова // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов Материалы Междунар науч -практич конф , посвящ 80-летию со дня рождения И А Хорькова / ВНИТИБП – Щелково, 2006 – С 64-68

4 Селекция штамма РБ-71 вируса бешенства / В И Жестерев, М А Филатова, О Г Лаптева, Т Ф Горшкова // Ветеринария - 2007 - №10 - С 52-54

5 Оценка биологических свойств штамма РБ-71/10 вируса бешенства/ О Г Лаптева, В И Жестерев, Е Н Глухарева, М А Филатова // Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках нацпроекта «Развитие агропромышленного комплекса» материалы Междунар конф 28-30 ноября 2007 г – Казань, 2008 – С 94-97

Отпечатано в типографии ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ,
г Покров Владимирской области

Тираж 75 экз