

На правах рукописи

КОРИЦКАЯ МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ВАКЦИННОГО ШТАММА КС ВИРУСА
КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ**

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

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2005 г.

Работа выполнена в лаборатории средств специфической профилактики вирусных болезней ЗАО «Научно-производственное объединение НАРВАК».

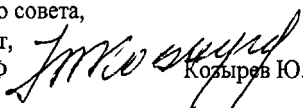
Научные руководители: доктор биологических наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РСФСР
Сергеев В.А.
доктор биологических наук
Непоклонов Е.А.

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук
Мищенко Н.К. (ФГУ ВГНКИ);
доктор ветеринарных наук, профессор
Куринов В.В. (ВНИИВВиМ РАСХН)

Ведущая организация: ФГУ Федеральный центр охраны здоровья животных (ФГУ ВНИИЗЖ).

Защита диссертации состоится 30 июня 2005 г. в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 при ФГУ Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов по адресу: г. Москва, Звенигородское ш., д.5, ФГУ ВГНКИ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ.
Автореферат разослан 26 мая 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук, доцент,
Заслуженный ветеринарный врач РФ 
Козлов Ю.А.

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы

Классическая чума свиней (КЧС) является наиболее опасной вирусной болезнью свиней, причиняющей серьезный экономический ущерб многим странам с развитым свиноводством. КЧС, в зависимости от штамма вируса, протекает в острой, хронической и инапаратной формах, характеризуется высокой контагиозностью и летальностью до 100% (Edwards S. et. AL, 2000; Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И., 2001; Van Oirschot, 2003; Прудников СИ. и др., 2003). По данным Международного Эпизоотического Бюро (МЭБ, 2000) КЧС относится к группе особо опасных болезней животных.

Вирус КЧС вместе с вирусом диареи (ВД) крупного рогатого скота и вирусом пограничной болезни овец (ПБО) образуют род пестивирусов в семействе флавивирусов. Кроме структурно-морфологического сходства эти вирусы имеют тесное антигенное родство между собой (Collet M., et al., 1988; Moenning V., 1990).

Вирус КЧС способен размножаться в клеточных культурах различных видов млекопитающих (Pirtle E., Kniazeff A. 1968), однако он накапливается в высоком титре главным образом в культурах клеток свиного происхождения. Отличительной особенностью вируса КЧС является способность размножения, как правило, без цитопатического эффекта (ЦПЭ), даже в клеточных культурах естественного хозяина (Moenning, 1990).

Имеются отдельные сообщения (Gillespie J., et al., 1962, Laude, H., 1978) о слабовыраженном ЦПЭ отдельных штаммов вируса КЧС. Размножение вируса КЧС с отчетливо выраженным ЦПЭ наблюдали лишь в культуре клеток стромы костного мозга поросят недельного возраста (Shimizu Y., et al., 1995) и в линии СРК-NS клеток почки свиньи, полученной и выращиваемой в среде без сыворотки (Sakoda Y., et al., 1998).

Специфическая профилактика КЧС основывается на применении живых безопасных и высокоиммуногенных вакцин. В мировой практике используют живые вакцины, различающиеся между собой главным образом способом размножения вакцинного штамма вируса и его накоплением. Вакцинные штаммы вируса КЧС размножают или на кроликах или в культуре клеток (Vandeputte Y., Chappuis G., 1999). В обоих случаях наиболее широко используют китайский штамм (С-штамм) (Van Oirschot, 2003), аттенуированный длительным пассированием на кроликах (более 800 пассажей) (Oleksiewicz M., et al., 2003).

В 1967 г. в СССР впервые были созданы две культуральные вакцины против КЧС: ВГНКИ (Лихачев Н.В., Мищенко Н.К.) и ЛК-ВНИИВВиМ (Сергеев В.А., Попов В.И.). Вторая принципиально отличалась тем, что вакцинный штамм ЛК размножали в культуре клеток не свиного происхождения (в субкультуре клеток тестикулярной ткани ягнят). Эти вакцины существенно не отличались от аналогичных вакцин, применяемых в других странах. Положительный опыт борьбы с КЧС с помощью вакцинации накоплен во многих странах (Kutter D., 1999). Однако, опыт борьбы с КЧС в странах ЕС привел к выводу, что существующие в мире живые вакцины против КЧС и традиционные схемы их применения «способны защитить свиней от заболевания и гибели, но не от инфицирования» (Edwards S., 1998). Стратегия ликвидации КЧС путем тотального убоя свиней в неблагополучных хозяйствах, принятая странами ЕС, не приемлема для России по экономическим причинам. Единственным безальтернативным способом ликвидации КЧС без тотального убоя свиней является стратегия гипервакцинации (Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И.), для реализации которой требовалось создание новой живой вакцины с повышенной активностью. Решению этой актуальной задачи посвящена наша работа.

1.2. Цель и задачи исследований

Усовершенствование средств специфической профилактики классической чумы свиней на основе вакцинного штамма ЛК-КС с целью повышения активности сухой вакцины.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить иммунобиологические свойства вакцинного штамма ЛК-КС вируса КЧС;
- освоить и внедрить в исследовательскую практику изготовление и контроль вакцины методы количественного определения вакцинного вируса (PLA) и специфических антител (NPLA);
- провести ревизию и оптимизацию основных технологических этапов изготовления живой вакцины;
- усовершенствовать нормативную документацию на вакцину КС;
- наладить серийное производство вакцины КС в соответствии с потребностями ветеринарной практики.

1.3. Научная новизна исследований

Показано, что вакцинный штамм КС (ЛК-КС) генетически и фенотипически отличается от китайского вакцинного штамма СL вируса КЧС. Штамм депонирован во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве, в 1996г. и в GenBank(США) за №AF099102 (2003 г.) . Установлена прямая корреляция между концентрацией вакцинного вируса и иммуногенностью сухой вакцины КС для свиней. Определена возможность длительного хранения клеток ТЯ в жидком азоте без потери ростовых свойств и репродукции вакцинного штамма вируса КЧС. Изучена длительность персистенции вакцинного штамма в организме привитых свиней, что облегчает дифференциацию носительства вакцинного и полевых штаммов вируса КЧС.

Обратная зависимость уровня сероконверсии у вакцинированных свиней от дозы вакцины при ее титровании указывает на необходимость увеличения интервала времени между вакцинацией и определением титра ВНА (NPLA).

Рекомбинантный химерный вирус КЧС-ВД сохранил свойства обоих родителей: иммуногенные свойства вакцинного штамма вируса КЧС и цитопатогенность вируса ВД КРС.

1.4. Практическая значимость исследований

Разработаны и предложены для практического применения:

- вакцина КС против классической чумы свиней живая культуральная сухая. Извещение №1 об изменении ТУ 9384-018-000080-64-98, утверждено Генеральным директором «НПО НАРВАК» 20 марта 2003г. и согласовано с Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 20 марта 2003 г.

- наставление по применению вакцины КС против классической чумы свиней живой культуральной сухой. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 20 марта 2003г.

В результате оптимизации условий размножения, хранения и лиофилизации вируса, активность вакцины КС повышена в 10 раз по сравнению с базовым вариантом - вакциной Ж ВНИИВВиМ.

1.5. Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях ученого совета НПО НАРВАК (2000-2004гг), а также на научной международной конференции в г.Феодосия (2003 г.).

1.6. Публикации

По теме диссертации опубликованы 6 научных работ.

1.7. Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

- иммунобиологические свойства вакцинного штамма КС вируса КЧС;
- условия массового размножения и лиофилизации вакцинного штамма КС с целью изготовления сухой вакцины для практического применения;
- биологическая активность вакцинного штамма КС in vivo и in vitro;
- свойства рекомбинантного (химерного) штамма КЧС-ВД вируса КЧС.

1.8. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения. Список литературы включает 174 источника, в том числе 31 отечественных и 143 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 2 рисунками и 32 таблицами.

За проведение совместных исследований и помощь в работе приносим искреннюю благодарность сотрудникам НПО НАРВАК :Т.И.Алиперу, ММ.Демкиной, М.И.Мусиенко, Т.В.Гребенниковой, А.Н.Власовой, А.Д.Забережному, С.Н.Корженкову.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Вирусные штаммы. В исследованиях использовали, в основном, два производственных штамма вируса КЧС: аттенуированный (вакцинный) штамм КС и высоковирулентный штамм Ши-Мынь. Первый поддерживали размножением в культуре клеток ТЯ, второй - размножением в организме свиней, серонегативных к вирусу КЧС. Для длительного хранения их лиофилизировали или помещали на -70°C . Химерный вирус КЧС-ВД получен на основе инфекционного клона вакцинного штамма КС вируса КЧС (А.Д. Забережный и др., 2003). Последовательность гена поверхностного гликопротеина Е2 вируса КЧС была замещена на аналогичную последовательность цитопатогенного штамма NADL вируса диареи КРС. Трансфекция чувствительных клеток инфекционной

РНК химерного вируса сопровождалась серийным размножением вируса в культуре клеток РК-15, SK-6 и ТЯ.

2.1.2. Питательные среды, сыворотки, растворы. В работе использовали питательные среды: 0,5% ГЛА на растворе Хенкса (производства ИПиВЭ); MEM, DMEM, раствор Хенкса, 0,25% раствор трипсина, 0,02% раствор версена (производства НПО Нарвак). В питательные среды и растворы вносили антибиотики в обычно принятой концентрации.

Для выращивания культур клеток использовали сыворотку крови новорожденных телят («Gibco»), а также сыворотку крови плодов крупного рогатого скота (фетальную).

2.1.3. Культуры клеток. Первичные культуры, субкультуры клеток и культуры перевиваемых линий клеток готовили общепринятым способом, используя питательную 0,5% ГЛА на растворе Хенкса с 7-10% сыворотки крови свободной от антител к вирусу диареи КРС.

2.1.4. Определение инфекционной активности вируса в культуре клеток. Вирусный антиген выявляли методом PLA (peroxidase-linked-assay). Суспензию клеток РК-15 вносили в 96-луночные плашки (Nunc). Десятикратные разведения вируса делали в 96-луночных плашках (180мкл среды + 20 мкл вируса) или в 24-луночных плашках (900мкл среды + 100 мкл вируса) и вносили их в плашки с культурой клеток. После внесения разведений вируса в суспензию клеток, плашки инкубировали в СОг-инкубаторе 3-4 суток.

По истечении срока инкубации из плашек удаляли ростовую среду, монослой промывали PBS и в лунки вносили фиксирующий раствор. Плашки помещали в холодильник на +4°C на 1 час.

После удаления фиксирующего раствора монослой клеток высушивали и использовали для выявления вирусного антигена в клетках, инфицированных разными разведениями вируса. В лунки вносили по 0,05 мл специфической кроличьей антисыворотки в рабочем разведении, выдерживали 60 мин при 37°C. Лунки планшета промывали буфером (PBST), вносили по 0,05 мл антикроличьих антител, меченных пероксидазой хрена, инкубировали 1 час при 37°C. Лунки планшета вновь промывали буфером (PBST) и вносили раствор хромогена диэтилкарбазола. Планшеты просматривали под световым микроскопом. Окрашивание клеток в темно-красный цвет свидетельствовало о наличии антигена вируса КЧС.

2.1.5. Выявление вирусного антигена методом иммунофлуоресцентного анализа (МФА). Для постановки реакции иммунофлуоресценции использовали 96-луночные плашки с культурой клеток РК-15, зараженной десятикратными разведениями вируса

(титрование по описанной ранее методике). Через 96 часов инкубации монослой промывали PBS и фиксировали в спирт-ацетоне. После фиксации плашки сушили и затем монослой инкубировали с прямым анти-КЧС конъюгатом (меченным FITC) в течение 1 часа при 37°C, промывали (3 раза PBS, 3 раза - водой). Затем монослой обрабатывали контрастирующим агентом Evans Blue (Sigma) и учитывали результат под флюоресцентным микроскопом.

За титр инфекционности вируса принимали максимальное разведение, вызывающее инфицирование клеток в 50% лунок и выражали в дозах инфицирующей культуры клеток (lg ТКИД₅₀/мл). Вирус, нейтрализованный специфической антисывороткой, не выявлялся методами PLA и МФА.

2.1.6.Выявление антител в реакции нейтрализации (NPLA). Для постановки реакции делали двукратные разведения исследуемых сывороток в 96-луночных планшетах в 0,1 мл на ростовой среде, содержащей 100-500 ТКИД₅₀ вируса КЧС (штамм КС) и инкубировали 1 час при 37°C.

Суспензию клеток РК-15 разливали по 0,1 мл в 96-луночные плашки и добавляли по 0,1 мл каждого разведения сыворотки.

Плашки с культурой клеток помещали в СОг-инкубатор на 3-4 суток. По окончании срока инкубации содержимое лунок удаляли и фиксировали монослой по описанной ранее методике. После удаления фиксирующего раствора монослой клеток высушивали и использовали для постановки реакции (PLA).

Вируснейтрализующий титр сыворотки выражали как максимальное ее разведение, ингибирующее репродукцию вируса в 50% лунок с зараженной культурой клеток.

2.1.7.Выявление антител методом ИФА. Антитела к вирусу КЧС кроме реакции нейтрализации выявляли методом ИФА с помощью «Набора реагентов для определения антител к вирусу КЧС иммуноферментным методом «КЧС-серотест» (ТУ 9388-082-00008064-98).

2.1.8.Полимеразная цепная реакция. Вакцинный штамм вируса КЧС выявляли методом обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Контаминацию клеточных культур вирусом ВД определяли методом ПЦР.

2.1.9.Лиофилизация вакцины КС. Вакцинный вирус лиофилизировали в присутствии криозащитной среды. Готовили 7 криозащитных сред, в состав которых входили сахароза, желатоза, ГЛА, глутамат Na, сухое молоко, сыворотки крови. Компоненты защитных сред стерилизовали автоклавированием, фильтрованием или гамма лучами (2 млн. рад). Стерильные компоненты объединяли в различных

соотношениях с вирусосодержащей жидкостью, помещали по 1 мл в 3 мл флаконы и лиофилизировали.

Процесс лиофилизации включал три этапа: замораживание, сублимацию и досушивание. Смесь культурального вируса со средой высушивания (по 1мл в 3 мл флаконах) замораживали (6-8 часов) до полного замораживания материала (-45°C).

Сублимацию проводили при вакууме около 0,160 мбар. При этом температура в материале поддерживалась в зоне эвтектики в температурном диапазоне между нижней (-38°C) и верхней (-31°C) эвтектическими температурами не менее 50 часов.

После удаления из материала около 90% влаги проводили досушивание в течение 15 часов при температуре в материале 25°C.

2.1.10. Ускоренное «старение» вакцины. 6 флаконов с сухой вакциной каждой серии выдерживали в течение 7 суток при 37°C. По истечении этого срока пробы титровали в культуре клеток РК-15 и определяли инфекционную активность методом PLA.

Активность вакцины после ускоренного старения не должна снижаться более чем на $2,01 \text{lgTKID}_{50}/\text{мл}$.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Чувствительность культур клеток к вирусу. Изучали чувствительность 6 линий клеток к вакцинному штамму вируса КЧС. С этой целью использовали линии клеток ткани почек: свиньи (РК-15, РК-1, СПЭВ), сайгака (ПСК), горного козерога (ПСГК) и зеленой марышки (Vero). В качестве положительного стандарта использовали субкультуру клеток ТЯ, в которой вакцинный штамм ЛК-КС вируса КЧС хорошо размножался.

Инфицированные культуры инкубировали при 37°C в течение 3-4 дней. Наличие вируса в культурах различных линий клеток определяли после 5, 6 и 7-го пассажей методом ОТ-ПЦР.

Учитывая данные литературы о возможной контаминации клеточных культур вирусом диареи крупного рогатого скота, источником которого является сыворотка данного вида животных, нами проведены соответствующие исследования. Контаминацию культур клеток ТЯ и 6 линий клеток вирусом ВД определяли методом ПЦР.

Исследовали неразведенную культуральную жидкость после однократного замораживания инфицированной культуры. Полученные результаты показали, что свободными от контаминации вирусом ВД при повторных исследованиях оказались культуры клеток ТЯ.СПЭВ и РК-15. Из 6 линий клеток к вакцинному штамму вируса КЧС

чувствительной оказалась только линия клеток РК-15. Все пробы вируса в этих культурах клеток после 5-7 пассажей были отрицательными в ПЦР.

2.2.2. Методы титрования вируса. Первоначально сравнивали чувствительность различных культур клеток свиного происхождения: субкультуры (1-й пассаж) клеток почки поросенка (ПП) и тестикул поросенка (ПТ), а также линии клеток почки поросят (РК-15) и тестикул поросят (ПТП). Стандартом чувствительности к вакцинному штамму служила субкультура клеток ТЯ (1-5 пассажей). Наиболее высокой чувствительностью обладали субкультура клеток ТЯ и линия клеток РК-15 (титр 6 проб вируса был в пределах 6,8-7,2 lg ТКИД₅₀/МЛ). Субкультуры ПП и ПТ обнаружили незначительно меньшую чувствительность (6,5-6,7 lg ТКИД₅₀/МЛ). Перевиваемая линия клеток ПТП оказалась слабо чувствительной (4,2-5,0 lg ТКИД₅₀/МЛ). В дальнейшем сравнивали 3 варианта титрования 7 образцов вируса в культуре клеток ТЯ в полистироловых 96-луночных планшетах.

1-й вариант. В лунки с однослойной культурой вносили по 180 мкл среды и по 20 мкл вируса каждого разведения. 2-й вариант. В лунки вносили по 180 мкл суспензии клеток и по 20 мкл вируса каждого разведения. 3-й вариант клеток с одновременным разведением вируса. Во все лунки вносили по 180 мкл суспензии клеток; в первый ряд лунок добавляли по 20 мкл исходного вируса, в последующие ряды лунок вносили по 20 мкл смеси клеток с вирусом предыдущего разведения.

При титровании по вариантам 1 и 2 10-кратные разведения вируса готовили в пенициллиновых флаконах, а затем вносили в лунки с клетками. При титровании по варианту 3 внесение вируса сочеталось с его разведением.

Чувствительность 3-х вариантов титрования вируса оказалась сходной. Наиболее простым является титрование в суспензии клеток, с одновременным разведением вируса, так как при этом методе сокращается время получения результата с 7-8 до 4 дней (с учетом времени необходимого для выращивания культуры клеток). Этот метод в дальнейшем использовали при титровании вируса.

2.2.3. Продолжительность субкультивирования клеток ТЯ и накопление вируса. Клетки ТЯ способны к росту не более 9-10 пассажей (в отдельных случаях в течение 12 пассажей). До 7-го пассажа клетки, как правило, обладают выраженной ростовой способностью и при коэффициенте пересева 1:2-1:3 формируют монослой на 2-5 сутки, затем рост клеток замедляется, монослой формируется на 6-10 сутки, морфология клеток изменяется.

Субкультивирование клеток ТЯ на протяжении 6-7 пассажей в роллерных сосудах объемом 1 и 3 л обеспечивало высокое накопление вируса (6,7-7,5 lg ТКИД₅₀/МЛ). С

увеличением продолжительности субкультивирования клеток ТЯ накопление вируса снижалось. В дальнейших опытах для выращивания вируса, как правило, использовали клетки ТЯ, выращенные в течение 3-6 пассажей.

2.2.4. Накопление вируса в роллерной и статической культуре. Субкультуры клеток ТЯ выращивали в матрасах 1,5-2 л, в пластиковых многополочных "фабриках" фирмы Nunc (Голландия) и роллерных флаконах 1 и 3 л. Однослойную культуру клеток ТЯ 1-6 пассажей заражали вирусом по стандартной методике и инкубировали 4 дня. В каждом опыте концентрацию вируса определяли в пробах, взятых из 2-3 аналогичных сосудов после окончания периода культивирования вируса.

В роллерной культуре (табл.1) накопление вируса было более интенсивным. Это, вероятно, в основном связано с относительно большим числом клеток ТЯ на единицу объема поддерживающей среды, а также с особенностями условий роллерного культивирования.

Таблица 1
Накопление вируса в культуре клеток ТЯ при разных способах культивирования

Культуральные сосуды	Кол-во клеток/мл	Кол-во опытов	Титр вируса (lg ТКИД ₅₀ /мл) в различных опытах
Матрасы 1,5 л	70000	13	6,5-7,5 [^] (7,2)
Матрасы 2 л	85000	12	7,0-7,5(7,3)
«Фабрики» Nunc	70000	3	6,7-7,3 (7,0)
Роллерные флаконы 1л и 3л	250000-400000	16	6,7-8,0(7,5)

В скобках указан средний титр вируса.

2.2.5. Накопление вируса в клетках ТЯ и среде в процессе культивирования. Клетки ТЯ (1-3 субкультура) выращивали в 1л роллерных флаконах и заражали внесением вируса (Юмл-7,0 lg ТКИД₅₀) в поддерживающую среду (100 мл). Инфицированную культуру инкубировали 1-5 дней при 37°С. Изучали накопление вируса в культуральной жидкости (КЖ) и в клетках, для чего ежедневно брали по 3 сосуда с инфицированной культурой и определяли содержание вируса в КЖ до замораживания и в цельной культуре (ЦК) после замораживания с целью освобождения вируса из инфицированных клеток. Ежедневно брали объединенную пробу из 3 аналогичных сосудов с инфицированной культурой.

Из данных, приведенных на рис. 1. видно, что вирус максимально накапливался через 3-4 дня. Через 5 дней титр вируса оставался на прежнем уровне или незначительно снижался. Через 2-5 дней культивирования основная масса вируса (около 90%) оставалась

связанной с клетками культуры, которая внешне не отличалась от аналогичной неинфицированной культуры клеток ТЯ. Однократное замораживание инфицированной культуры позволяет освободить основную массу внутриклеточного вируса и увеличить его выход в КЖ примерно в 5 раз (с 7,0 до 7,7 lg ТКИД₅₀/мл).

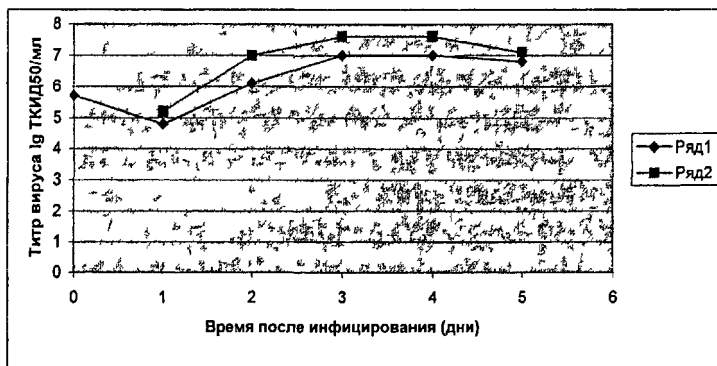


Рис 1 Накопление вируса в роллерной культуре в процессе культивирования.

Содержание вируса в культуральной жидкости до разрушения клеток (1) и после разрушения клеток замораживанием (2)

2.2.6 Способ заражения культуры клеток. Роллерную культуру клеток заражали с адсорбцией и без адсорбции вируса на клетках

Вирус вносили в культуральные сосуды после удаления ростовой среды перед или одновременно с внесением поддерживающей среды и инкубировали 3-4 суток. Накопление вируса при обоих способах заражения культуры было практически одинаковым (7,4 и 7,5 lg ТКИД₅₀/мл). Адсорбция вируса на клетках перед внесением поддерживающей среды не влияет на его накопление, а лишь усложняет технологический процесс получения вируса. В другом варианте опытов сравнивали накопление вируса при заражении выросшей монослойной культуры и клеток ТЯ при посеве.

В последнем случае поддерживающая среда содержала от 5 до 8% сыворотки плода КРС. В обоих случаях использовали разные заражающие дозы вируса, а культивирование длилось 4 суток.

Установлено, что накопление вируса (6-7,5 lg ТКИД₅₀/мл) не зависит от способа заражения культуры (на монослой или в суспензию клеток). Заражение в суспензию упрощает и ускоряет процесс накопления вируса, но в этом случае необходимо

использовать клетки ТЯ с высокой ростовой потенцией и сыворотку без антител к вирусу **ВД.**

2.2.7.Заражающая доза вируса. Роллерную культуру клеток ТЯ заражали с различной множественностью: 0,1; 1,0; 10 lg ТКИД₅₀/мл на 1 клетку. Каждой дозой вируса заражали по 3 роллерных культуры. Инфицированные культуры инкубировали 4 сут. Для титрования брали среднюю пробу вируса из 3 аналогичных культур. Опыты повторяли 3 раза.

Полученные результаты (табл. 2) показали, что накопление вируса находится в зависимости от дозы заражения. Для получения вируса в максимальной концентрации (7,5-7,7 lg ТЦД₅₀/мл) роллерную культуру клеток ТЯ следует заражать вирусом в соотношении ~1 ТКИД₅₀ на 1 клетку и культивировать 4 дня при 37°С.

Таблица 2

Влияние дозы заражения на накопление вируса в культуре клеток ТЯ

Число пассажей клеток ТЯ	Возраст культуры клеток, дни	Заражающая доза вируса (lg ТКИД ₅₀ на клетку)	Накопление вируса (lg ТКИД ₅₀ /мл) через 96 часов			
			№ опыта			средние данные
			1	2	3	
2-3	2-3	0,1	6,7	6,7	6,2	6,5
2-3	2-3	1	7,5	7,3	7,7	7,5
2-3	2-3	10	7,2	7,5	7,2	7,3

2.2.8.Замораживание клеток ТЯ. В связи с сезонностью рождения ягнят и получения тестикулярной ткани изучали возможность хранения клеток ТЯ в жидком азоте. Клетки первичной культуры ресуспендировали в криозащитной среде, помещали в ампулы и хранили в жидком азоте до приготовления культуры. При восстановлении культуры замороженную суспензию клеток вносили в культуральный сосуд (1,5 л матрасы) и добавляли ростовую среду. Через 24 ч проводили смену среды. Отмечена корреляция жизнеспособности клеток ТЯ до и после хранения в жидком азоте.

Чувствительность к вирусу клеток ТЯ (3-7 субкультура) до и после замораживания сравнивали путем титрования нескольких образцов вируса. Условия выращивания клеток и титрования вируса в обоих случаях были одинаковыми. Титр вируса в обеих культурах оказался практически одинаковым (7,5 и 7,3 lg ТКИД₅₀/мл). В других опытах изучали размножение вируса в роллерной культуре клеток ТЯ до и после хранения в жидком азоте (1-

1,5 г.). Незамороженные и замороженные клетки обладали хорошей ростовой способностью и были использованы для репродукции вируса на уровне 1-7 субкультур. Роллерные культуры заражали с высокой множественностью (7,0 lg ТКИД₅₀/мл), инкубировали 4 дня, после чего клетки разрушали кратковременным замораживанием (от -20° до -60°С, 30 мин -1 час) и определяли титр вируса..

Установлено, что клетки ТЯ, хранившиеся в жидком азоте 6-18 месяцев, сохранили выраженную способность к росту в культуре и репродукции вируса КЧС (табл. 3). В роллерной культуре, приготовленной из клеток, подвергшихся и не подвергшихся замораживанию, вирус накапливался в высоком титре (6,5-7,7 lg ТКИД₅₀/мл). Таким образом, установлена возможность использования в производстве вакцины КС клеток ТЯ хранившихся в жидком азоте не менее 1-1,5 лет.

Таблица 3

Влияние замораживания клеток ТЯ на размножение вируса

Продолжительность хранения клеток в жидком азоте, мес	Накопление вируса (lg ТКИД ₅₀ /мл) в культуре клеток различных пассажей					Средний титр вируса (lg ТКИД ₅₀ /мл)
	1	2	3	4-5	6-7	
6-8	Н.и.	6,2	6,7	6,2	6,7	6,7
	Н.и.	6,7	7Д	6,7	7,2	
12	6,7	6,7	6,2	5,2	6,7	7,0
	7,7	7,2	7,0	6,7	7,2	
	н.и.	7,7	7,7	7,2	7,7	
18	7,2	7,7	6,7	7,7	7,2	7,4
	7,7	7,0	7,7	н.и.	7,0	
Клетки до замораживания (контроль)	6,5	6,7	7,0	6,7	6,7	7,2
	6,7	7,5	7,2	7,7	7,2	
	7,7	7,7	7,7	ни	7,7	

н.и.-не исследовано

2.2.9.Наличие антител к вирусу ВД в ростовой среде. Наличие антигенной связи между ВД и КЧС, а также частое присутствие антител к ВД в сыворотке крови КРС, хорошо известно. Учитывая эти обстоятельства, исследовали размножение штамма КС вируса КЧС в культуре клеток ТЯ, выращенной с сывороткой КРС (эмбриональной или телячьей), содержащей нейтрализующие антитела (ВНА) к ВД в титре 1:16. Определяли влияние антител на накопление вируса в клеточной культуре и на чувствительность клеток ТЯ при титровании вируса. Клетки ТЯ выращивали в среде 0,5% ГЛА с 7% сыворотки, содержащей или не содержащей ВНА к ВД. В опытах по изучению влияния

антител на накопление вируса ростовую среду заменяли на поддерживающую среду без сыворотки и вносили вирус (10^7 ТКИД₅₀/мл). В ряде опытов клеточный монослой перед заражением промывали 2-3 раза поддерживающей средой для удаления остатков сыворотки, присутствовавшей в ростовой среде. Инфицированные культуры клеток ТЯ инкубировали при 37°C 3-4 дня и титровали в культуре клеток ТЯ, выращенной в отсутствии антител к ВД.

Выращивание клеток ТЯ в среде с сывороткой, содержащей нейтрализующие антитела к вирусу диареи КРС в титре 1:16, не влияет на накопление штамма КС в роллерной культуре ($7,0-7,5$ lg ТКИД₅₀/мл), если при заражении использовать среду без сыворотки.

При титровании вируса необходимо выращивать клетки в отсутствии антител с самого начала, или перед отделением клеток от стекла промывать монослой 2-3 раза, суспензию клеток готовить в среде с сывороткой без антител к ВД или перед титрованием клетки выращивать в течение 1-2 пассажей с сывороткой без антител к ВД.

Таблица 4

Влияние антител к вирусу ВД на размножение вакцинного штамма КС в культуре клеток

Накопление вируса	
Характеристика культуры перед заражением	lg ТКИД ₅₀ /мл
4-7 пассажей в присутствии сыворотки с ВНА к ВД (1:16) перед заражением смена среды на бессывороточную	7,0-7,5
То же + отмывание монослоя 2-3 раза перед заражением	7,0-7,5
То же + 1 пассаж клеток с сывороткой без антител	7,0-7,5
4-7 пассажей с сывороткой без антител (контроль)	7,0-7,5

2.2.10. Персистенция вакцинного штамма КС у привитых свиней по данным ПЦР.

Длительность присутствия вакцинного штамма КС вируса КЧС в организме привитых свиней определяли с целью возможной дифференциации вакцинированных и невакцинированных животных. В первом опыте 4-х свиней 80-90-дневного возраста, серонегативных к вирусу КЧС, прививали вакциной КС однократно внутримышечно в дозе, рекомендованной наставлением для благополучных по КЧС хозяйств (1000 ИмДбо). Наличие вируса КЧС в крови привитых свиней определяли методом ПЦР. Кровь для исследования брали на 2, 3, 4, 7, 14, 21 дни после вакцинации. В каждый из указанных периодов исследовали кровь от 4 животных. Кроме наличия вируса КЧС в крови определяли вируснейтрализующие антитела (ВНА) методом NPLA.

Таблица 5

Наличие вакцинного штамма КС и нейтрализующих антител в крови поросят через различные периоды после вакцинации (1000 ИмД₅₀)

Время после вакцинации (дни)	Наличие вируса (ПЦР)	Наличие ВНА (NPLA)
2	4/4	
3	4/4	
4	4/4	
7	2/4	+
14	0/4	+
21	0/4	+

числитель-количество положительных проб;
знаменатель-количество исследованных проб.

Приведенные в таблице данные показывают, что вакцинный вирус обнаруживается в крови у 50% поросят в течение 7 дней после вакцинации. Через 14 дней и позже после прививки вакцинный вирус в крови поросят не обнаруживался. Таким образом, вакцинный штамм КС вируса КЧС персистирует в крови свиней, иммунизированных в дозе 1000 ИмД₅₀, в течение 7 дней и исчезает между 7-14 днями после вакцинации. Специфические ВНА удавалось обнаружить в крови свиней через 7 дней после вакцинации.

В другом опыте исследовали персистенцию вакцинного штамма в зависимости от дозы вакцины. Вакциной в дозе 10000 и 100000 ИмД₅₀ прививали внутримышечно по 4 серонегативных свиньи 80-90-дневного возраста. Кровь для определения вируса брали периодически в течение 20 дней после вакцинации. Через 20 дней после вакцинации по 2 свиньи из каждой группы были убиты и взяты пробы органов (селезенка, лим. узлы) для исследования на наличие вируса.

Таблица 6

Обнаружение вакцинного штамма КС в крови и органах поросят при введении разных доз вакцины

Доза вакцины (ИмД ₅₀)	Дни после вакцинации							
	2	4	6	7	11	13	15	20
10000	4/4	4/4	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4(0/2)
100000	4/4	4/4	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4(0/2)

числитель- количество положительных проб;
знаменатель- число исследованных проб;
в скобках указаны результаты обнаружения вируса в органах убитых свиней.

Результаты этих опытов показали, что вакцинный штамм КС быстро элиминирует из организма свиней, привитых в дозах 10^4 и 10^5 ИмД₅₀. Через 15-20 дней его не удавалось обнаружить в крови и органах свиней, привитых разными дозами вакцины. Таким образом, установлено, что вакцинный вирус исчезает из организма не позже, чем через 15 дней после прививки.

2.2.11. Реактогенность штамма КС для кроликов. Одним из фенотипических свойств вакцинного штамма СL, размноженного в организме кроликов или адаптированного и размноженного в культуре клеток, является способность размножаться и вызывать термическую реакцию у привитых кроликов. Представлял интерес сравнить штаммы КС и СL по этому признаку.

3 кролика массой 1,5-2,0 кг прививали штаммом КС внутривенно в дозе 6,0 lg ТКИД₅₀ (2мл). 3 кролика привили лапинизированным штаммом СL, размноженным на кроликах (дефибринированная кровь), внутривенно в дозе 3,0 lg ИД₅₀ (для кроликов). 2 кролика оставлены непривитыми в качестве контроля. До и после введения вируса в течение 4 дней утром и вечером измеряли температуру тела, по которой судили о реакции на введение двух вакцинных штаммов вируса.

Результаты этого опыта показали, что штамм КС в отличие от штамма СL не вызывал гипертермию у кроликов при внутривенном введении. Неспособность штамма КС вызывать гипертермию у кроликов может служить фенотипическим маркером, отличающим его от штамма СL. Полученные данные согласуются с результатами генотипирования этих штаммов (А.Д. Забережный и др., 2000).

2.2.12. Антигенная и иммуногенная активность трех коммерческих живых вакцин **против КЧС**. Опыт проводили на свиньях крупной белой породы в возрасте 80-90 дней, серонегативных в отношении вируса КЧС. Для иммунизации животных использовали производственные серии трех сухих вакцин: Рlivas из штамма СL, размноженного на кроликах (фирма «Рliva» (Хорватия); ЛК-ВНИИВВиМ из штамма ЛК, адаптированного и размноженного в субкультуре клеток тестикулярной ткани ягнят (Покровский завод биопрепаратов, Россия); КС из штамма КС, адаптированного и размноженного в субкультуре клеток тестикулярной ткани ягнят (НПО НАРВАК, Россия).

Каждой серией вакцины прививали по 5 свиней однократно внутримышечно в объеме 2 мл в соответствии с наставлением по их применению. Две свиньи оставляли не вакцинированными (контроль).

Инфекционную активность вакцины «Рlivas» оценивали на кроликах, двух других - в культуре клеток РК-15 (PLA). Титр вируса в указанных вакцинах составлял соответственно 4,0 lg ИД₅₀/мл; 5,5 и 6,5 lg ТКИД₅₀/мл.

Через 21 день после вакцинации всех животных заражали подкожно вирулентным штаммом Ши-Мынь вируса КЧС в дозе 10⁵ ЛД₅₀, после чего в течение 14 дней проводили клинические наблюдения и измеряли температуру тела.

У всех свиней на 14, 21 и 35-е сутки после вакцинации брали кровь для определения титра нейтрализующих антител методом NPLA. Кроме того, наличие

вируссpezifических антител в сыворотке крови вакцинированных свиней выявляли конкурентным методом ИФА при использовании коммерческого набора "Chekit-CSF-SERO" (Швейцария). По интенсивности торможения реакции антиген-антитело рассчитывали коэффициент ингибирования.

Главным критерием иммуногенности вакцин является защита свиней от заболевания и гибели после заражения вирулентным штаммом вируса КЧС. Уровень специфических антител к вирусу КЧС до и после контрольного заражения принимали во внимание в качестве дополнительного критерия иммуногенности и антигенности вакцины.

У вакцинированных животных нейтрализующие антитела были обнаружены во все периоды исследований. Титр антител на 21-е сутки был выше, чем на 14-е сутки после вакцинации. Максимальный титр антител выявлен через 2 нед. после заражения вирулентным штаммом вируса (35-е сут.). Во все периоды после вакцинации титр нейтрализующих антител был выше у свиней, привитых вакциной КС.

Определение специфических антител конкурентным методом ИФА показало, что по мере увеличения периода после вакцинации их активность в сыворотке крови возрастала и достигла максимального значения через 14 сут. после контрольного заражения (35-е сутки после вакцинации). После заражения их активность возросла в 2-3 раза.

Таблица 7

Титр вируснейтрализующих антител (NPLA) в сыворотке крови свиней в различные периоды после вакцинации разными препаратами Qog2)

№ животного	До вакцинации	После вакцинации, сут.		
		14	21	35
Вакцина Plivac				
1	<1,5	2,5	6,0	7,5
2	<1,5	2,5	4,5	7,5
3	<1,5	3,0	4,0	10,0
4	<1,5	3,5	4,5	9,0
5	2,0	3,0	4,0	8,0
Вакцина «КС»				
6	<1,5	4,5	7,0	7,0
7	<1,5	3,5	5,5	8,0
8	<1,5	4,0	4,5	7,5
9	<1,5	4,0	8,0	8,5
10	<1,5	4,0	7,5	8,0
Вакцина «ЛК-ВНИИВВиМ»				
11	<1,5	3,5	6,0	7,5
12	<1,5	3,0	6,0	8,0
13	<1,5	3,5	4,5	7,5
14	<1,5	3,5	5,0	7,5
15	<1,5	3,0	5,0	8,0

Не выявлено принципиальных различий в иммуногенности и антигенности между лапинизированной вакциной из штамма LC (Plivac) и культуральными вакцинами ЛК-ВНИИВВиМ и КС.

Эти вакцины являются безвредными, ареактогенными для свиней, обладают выраженной иммуногенностью и обеспечивают защиту животных от заболевания и гибели при заражении вирулентным штаммом вируса КЧС. Вакцина КС характеризуется более высокой инфекционной активностью по сравнению с двумя другими вакцинами. После заражения вирулентным штаммом вируса КЧС у вакцинированных животных наблюдали повышение титра специфических антител примерно в 4 - 8 раз (бустерный эффект), что, вероятно, свидетельствует о приживляемости вирулентного вируса в организме свиней, несмотря на их устойчивость к заболеванию при заражении летальной дозой вирулентного вируса.

2.2.13. Иммунобиологические свойства химерного вируса КЧС-ВД КРС.

Стабильность репликации химерного штамма изучали параллельно в течение 10 последовательных пассажей в культурах клеток РК-15 и ТЯ. В отличие от исходного вакцинного штамма КС химерный вирус размножался с цитопатическим эффектом (ЦПЭ), который усиливался по мере инкубирования при 37°C и приводил практически к полному разрушению монослоя клеток через 120 часов после заражения.

Накопление вируса при серийном пассировании было стабильным и практически одинаковым в обеих культурах клеток. Вирус накапливался в титре 6,5-7,0 lg ТКИД₅₀/мл. Активность вируса по ЦПЭ была значительно ниже (на 3,0-4,0 lg), чем в PLA.

Таблица 8

Накопление химерного вируса в двух культурах при оптимальном режиме культивирования

Культура клеток	Количество пассажей вируса	Титр вируса (lg ТКИД ₅₀ /мл)	
		PLA	ЦПЭ
РК-15	7	6,5	3,5
	8	7,0	3,8
	10	7,2	4,0
ТЯ	7	6,8	4,0
	8	6,5	3,5
	10	6,8	4,0

Экспериментальную серию сухой живой вакцины готовили из химерного штамма вируса КЧС 10-го пассажа в культуре клеток ТЯ.

Иммуногенность этой серии вакцины проверяли на 4-х серонегативных в отношении вируса КЧС свиньях в возрасте 80-90 дней. В качестве положительного контроля служили две свиньи, вакцинированные сухой живой вакциной КС. В качестве отрицательного контроля служили две не вакцинированные свиньи.

Свиней вакцинировали однократно внутримышечно в дозе 10000 ТКИД₅₀ - Всех свиней заражали интраназально вирулентным вирусом КЧС (штамм Ши-Мынь) в дозе 10⁵ LD₅₀ на 25-й день после вакцинации. За животными вели клиническое наблюдение в течение 30 дней после заражения.

Все вакцинированные свиньи обнаружили выраженную сероконверсию и не заболели после заражения.

Обе контрольные (не вакцинированные) свиньи заболели на 3-й день и погибли на 6-й и 9-й дни после заражения с признаками геморрагического диатеза, характерного для КЧС.

Полученные данные показали, что химерный вакцинный штамм КС-ВД отличается от исходного штамма КС способностью размножаться в культуре клеток с ЦП действием и аналогичен ему по уровню накопления в клеточной культуре ТЯ, иммуногенным и антигенным свойствам.

2.2.14. Корреляция биологической активности сухой вакцины КС при титровании в культуре клеток РК-15 и на свиньях. При изготовлении культуральной живой вакцины против КЧС определенные трудности доставляет контроль биологической активности (иммуногенности) вакцины. Эти трудности возрастают при проведении различных исследований на основе количественной оценки биологической активности аттенуированных штаммов и вакцин.

С этой целью изучена корреляция биологической активности 3 серий сухой вакцины КС при определении *in vivo* и *in vitro*. Биологическую активность каждой серии вакцины определяли в культуре клеток РК-15 в 3 повторностях. Биологическую активность тех же серий вакцины проверяли на серонегативных свиньях 60-70-дневного возраста. 10-кратными разведениями вакцины с учетом ее активности в культуре прививали внутримышечно по 2-3 свиньи, серонегативных к вирусу КЧС. Спустя 30 дней вакцинированных и контрольных свиней (2 головы) заражали вирулентным штаммом Ши-Мынь (5,0 Ig LD₅₀)- Иммуногенность вакцины определяли по защите свиней от заболевания и гибели через 15 дней после заражения и выражали в ИмД₅₀/мл. Другой способ оценки биологической активности тех же серий вакцины заключался в следующем.

От свиней, привитых различными разведениями вакцины, перед контрольным заражением (30 дней после вакцинации) брали сыворотку крови и определяли серопозитивность в NPLA. Появление серопозитивности у вакцинированных свиней считали проявлением биологической (иммуногенной) активности вакцины (титр ВНА $\geq 1:4$).

Таблица 9

Результаты сравнительного титрования биологической активности трех серий сухой вакцины КС в культуре клеток и на свиньях

Серии вакцины	Биологическая активность вакцины	
	в культуре клеток РК-15 (lg ТКИД ₅₀ /мл)	на свиньях (lg ИмД ₅₀ /мл)
№1	6,3; 6,5; 6,7;	6,0; (6,3)
№2	6,5; 6,7; 6,7;	6,3; (6,5)
№3	6,7; 6,8; 6,0	6,0; (6,2)

в скобках указана активность вакцины по данным сероконверсии

Результаты этих исследований показали практическую равноценность двух методов титрования биологической активности вакцинного вируса КС (ИмД₅₀=ТКИД₅₀). Активность 3 серий вакцины в среднем составляла: в культуре клеток РК-15 (PLA) 6,3 lg ТКИД₅₀/мл; по защите свиней при контрольном заражении - 6,1 lg ИмД₅₀/мл и по сероконверсии у свиней - 6,3 lg ИмД₅₀/мл. Эти данные учитывали при определении иммуногенности сухой вакцины в дальнейших исследованиях.

При определении иммуногенной активности вакцины на свиньях методом контрольного заражения установлена прямая зависимость между дозой вакцинного вируса и титром специфических антител в реакции нейтрализации (NPLA) через 35 дней после вакцинации. Однако разница в титре антител в РН в этот период не влияла на устойчивость вакцинированных свиней к заражению вирулентным штаммом вируса КЧС.

С целью повышения точности оценки титра вируса в вакцине по сероконверсии у свиней, привитых минимальными дозами вакцины, кровь для исследования (NPLA) следует брать через ≥ 35 дней после вакцинации.

2.2.15. Изготовление и контроль сухой вакцины КС. Вакцинный штамм КС размножали в ролирной культуре клеток ТЯ при оптимальных условиях. В течение 1997-2004 гг. было произведено более 1500 литров вируса с активностью 6,0-7,7 lg ТКИД₅₀/мл, который использовали для изготовления сухой вакцины КС. Культуральный вирус проверяли на отсутствие вирусной и бактериальной контаминации и на инфекционную активность. До использования в вакцину его хранили при -60-70°C. При изготовлении вакцины культуральный вирус смешивали с криозащитной средой, разливали по 1 мл в 3 мл флаконы и подвергали высушиванию. При изготовлении экспериментальных серий

сухой вакцины использовали лабораторные установки для лиофилизации вместимостью 300-1000 флаконов (3мл). Для производственных целей использовали промышленные лиофилизаторы «Виртис» и «Мартин-Христ» вместимостью соответственно 7000 и 18000 флаконов. При выборе оптимального режима высушивания определяли эффективность использования 7 криозащитных сред. Качество промышленных серий сухой вакцины КС оценивали согласно ТУ: наличие вакуума во флаконах, макровид сухого препарата, растворимость, массовая доля влаги, инфекционная активность, безвредность и иммуногенность. Иммуногенность сухой вакцины определяли на серонегативных поросятах массой 3040 кг. Вакциной в дозе 50 и 500 ТКИД₅₀/мл прививали внутримышечно по 2 свиньи. Через 15 дней 4 вакцинированных и 1 контрольную свинью заражали вирулентным штаммом Ши-Мынь и наблюдали еще 15 дней. Все серии сухой вакцины, проверенные этим способом, оказались безопасными и иммуногенными. Кроме того, определяли снижение титра инфекционности при ускоренном старении вакцины и в процессе продолжительного ее хранения при 2-8°С. Для практического применения выпускали те серии вакцины, которые полностью отвечали требованиям ТУ. Некоторые характеристики 10 серий сухой вакцины КС приведены в таблице.

Таблица 10

Некоторые параметры 10 серий сухой вакцины КС

№ серии	Наличие вакуума	Массовая Доля влаги %	Титр вируса в сухой вакцине (lg ТКИД ₅₀ /мл) после хранения при 2-8 С (мес.)					Титр (lg ТКИД ₅₀ /мл) вакцины при ускоренном старении (37°С, 7 дней)
			0	3	6	9	12	
1	+	-	6,2	6,2	6,2	5,7	6,0	4,2
2	+	-	6,7	6,0	6,0	5,7	5,7	4,0
3	+	-	6,0	6,2	6,0	6,0	5,7	4,3
4	+	1,3	6,0	6,0	6,0	6,0	5,5	4,2
5	+	0,9	6,5	6,7	6,2	6,2	5,7	5,0
6	+	0,8	6,2	6,7	6,2	6,2	5,6	4,7
7	+	3,9	6,2	6,23	6,23	5,23	5,23	5,5
8	+	2,6	6,3	6,23	6,0	6,0	5,33	4,2
9	+	2,6	6,0	6,0	6,0	5,0	5,0	4,7
10	+	3,0	6,2	6,23	6,2	5,76	5,23	5,0

№№ 1-6 - стабилизатор - М (сухое молоко)

№№ 7-10- стабилизатор - ГЖС

Результаты этих опытов показали, что через 6 месяцев хранения при минус 2 - минус 8 С все 10 серий сухой вакцины сохранили исходную инфекционную активность. Через 9 и 12 месяцев соответственно некоторые серии вакцины снизили

инфекционность на $1,0-1,7 \cdot 10^5$ ТКИД₅₀/мл. В процессе ускоренного старения инфекционная активность вакцины снижалась на $0,7-2,7 \cdot 10^5$ ТКИД₅₀/мл.

3.ВЫВОДЫ

Определены условия массового размножения вакцинного штамма КС в субкультуре клеток тестикулярной ткани ягнят (ТЯ), обеспечивающие получение вируса с титром $6,5-7,5 \lg$ ТКИД₅₀/мл.

Клетки первичной культуры ТЯ могут длительно храниться в жидком азоте без потери способности к субкультивированию и репродукции штамма КС.

Выращивание клеток ТЯ в среде с сывороткой, содержащей нейтрализующие антитела к вирусу диареи КРС в титре 1:16, не влияет на накопление штамма КС в роллерной культуре клеток.

Установлена корреляция биологической активности сухой вакцины КС при титровании в культуре клеток РК-15 (ТКИД₅₀) и на свиньях (ИмД₅₀). Иммуногенная активность вакцины для свиней практически равна инфекционной активности в культуре клеток (ИмД₅₀=ТКИД₅₀).

По длительности виремии, антигенным и иммуногенным свойствам для свиней штамм КС не отличался от двух широко известных вакцинных штаммов СL и ЛK вируса КЧС, однако в отличие от лапинизированного штамма СL он не обладал реактогенностью для кроликов.

Определены режим изготовления и методы контроля сухой вакцины КС, обеспечивающие гарантированную активность при хранении и эффективность применения в практических условиях.

Рекомбинантный химерный вирус КЧС-ВД сохранил антигенные и иммуногенные свойства исходного вакцинного штамма КС и приобрел способность вызывать ЦПД в культуре клеток ТЯ и РК-15. Титр вируса по ЦПД составлял 0,1% по сравнению с титром вируса в РLА.

В результате оптимизации условий размножения, хранения и лиофилизации вируса активность сухой вакцины КС повышена в 10 раз по сравнению с базовым вариантом - вакциной ЛK.

4. Практические предложения

На основании проведенных исследований и оптимизации режима культивирования вакцинного штамма КС вируса КЧС разработаны и предложены для практического применения:

- вакцина КС против классической чумы свиней живая культуральная сухая. Извещение №1 об изменении ТУ 9384-018-000080-64-98, утверждено Генеральным директором «НПО НАРВАК» 20 марта 2003г. и согласовано с Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 20 марта 2003г.
- наставление по применению вакцины КС против классической чумы свиней живой культуральной сухой. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 20 марта 2003 г.

5. Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.Н., Котельников А.П., Корицкая М.А., Демкина М.М. Гипервакцинация - новая стратегия ликвидации классической чумы свиней (КЧС) в хозяйствах промышленного типа.// Научный вестник национального аграрного университета, Киев-2001, стр.83-89.

2. Сергеев В.А., Корицкая М.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.Н. Сравнительная оценка антигенной и иммуногенной активности коммерческих живых вакцин против классической чумы свиней.// Сельскохозяйственная биология, 2003, №4, стр.96-98.

3. Корицкая М.А., Демкина М.М., Мусиенко М.И., Сергеев В.А. Корреляция биологической активности сухой вакцины КС против классической чумы свиней при титровании в культуре клеток РК-15 и на свиньях.// Ветеринарная медицина 82, Сб.научных работ, Харьков 2003, стр.728

4. Власова А.Н., Грабовецкий В.В., Корицкая М.А., Демкина М.М., Воркунова Т.К., Мусиенко М.И., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А., Забережный А.Д. Создание химерного вируса классической чумы свиней, содержащего ген E2 вируса диареи КРС.// «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных», Владимир, октябрь 2003, стр.159-164.

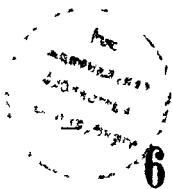
5. Корицкая М.А., Демкина М.М., Сергеев В.А. Культивирование вакцинного штамма вируса классической чумы свиней.// Вопросы вирусологии, №1, 2005, стр.42-46.

6. Корицкая М.А., Демкина М.М., Власова А.Н. Чувствительность методов титрования вируса КЧС. // Вопросы вирусологии, №2,2005, стр.46-48.

Подписано в печать 23.05.2005 г. Формат издания 60x88/16
Бум. тип. Усл. печ.л. 1,0 Тираж 100 экз. Заказ № 153

Отпечатано в ФГУП «ЭКСПЛОР»
107139, Москва, Орликов пер., д.3, тел. 207-80-52

15 012755



607