

На правах рукописи

УДК 619:616.98:636.32



РУМЯНЦЕВА Екатерина Анатольевна

**АДАПТАЦИЯ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НАЙРОБИ К КУЛЬТУРАМ
КЛЕТОК И ЕГО ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

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

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук.

ПОКРОВ - 2008

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

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник

Бальшев Владимир Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник

Кушнин Анатолий Тимофеевич

кандидат ветеринарных наук
старший научный сотрудник

Константинов Алексей Владимирович

Ведущее учреждение – ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (г. Москва)


Защита диссертации состоится **10 октября 2008 г. в 10 часов** на заседании диссертационного совета Д 006.003.01 при ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии по адресу: 601120, Владимирская обл., Петушинский район, г. Покров. ГНУ ВНИИВВиМ. Тел./факс: (49243) 62125.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИВВиМ.

Автореферат разослан «25» августа 2008г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Савукова В.Я.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы

Болезнь Найроби (БН) - зооантропонозная, остропротекающая, трансмиссивная болезнь мелких жвачных животных, проявляющаяся рецидивирующей лихорадкой, геморрагическим гастроэнтеритом, слизистогнойными истечениями из носа и абортами. Представляет опасность для здоровья человека [М.Р. Weinbren, 1963; И.А. Бакулов, 1983; F.G. Davies, 1997]. Согласно классификации Госкомсанэпиднадзора вирус БН отнесен ко II группе патогенности (опасности) для человека [СП 1.2.011.-94].

Возбудитель болезни – РНК-содержащий вирус семейства Bunyaviridae рода *Nairovirus* [D.H.L. Bishop, 1980; M.H.V. Regenmortel, 2000].

Переносчиками возбудителя болезни являются иксодовые клещи *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus bursa* и *Ambliomma gemma*. У клещей вирус передается потомству трансвариальным путем, в которых он способен сохраняться до 3-х лет. [D.P. Picavet, 1991; A.J. De Vos, 1981; M.P. Weinbren, 1958]. Увеличение количества вспышек болезни в неблагополучных районах наблюдается после периода ливневых дождей, что связано с благоприятными условиями для биологической активности клещей-переносчиков.

По данным R. Daubney (1934) и С. Terpstra (1970) вирус болезни Найроби в объектах внешней среды нестабилен и быстро инактивируется при положительных температурах.

К болезни чувствительны все возрастные группы животных, особенно молодняк, смертность которого может достигать 70-90%, взрослого поголовья - до 40% [G.M. Ege, 1967; M.P. Weinbren, 1958].

Впервые болезнь наблюдал Брассей Эдвардс в 1910г., когда расследовал причины массовой гибели овец на пастбищах вблизи г. Найроби (Кения).

Болезнь широко распространена в юго-восточной Африке (Кении, Уганде, Заире, Танзании, Мозамбик, Сомали, Эфиопии, ЮАР и др.). Согласно данным МЭБ вспышки этой болезни были также зарегистрированы на Ближнем Востоке (Кувейт 1995г.) и Европе (Греция 2003г.), что указывает на расширение нозоареала инфекции [M.P. Weinbren, 1958; С. Terpstra, 1970; OIE, 2004]. Выделенный в Индии вирус коз Ganjam рассматривается в настоящее время как азиатский вариант вируса болезни Найроби [C.N. Dandawate et al., 1969; B.I. Marczinke and S.T. Nichol; 2002].

Экономический ущерб, причиняемый болезнью Найроби, складывается из гибели животных, недополучения приплода, снижения продуктивности, затрат на проведение лечебно-профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Развивающиеся связи между Россией и африканскими странами, неблагополучными по болезни Найроби, свидетельствуют об угрозе заноса на её территорию возбудителя этой болезни. По данным отечественных исследователей экологической нишей вируса БН в природе на территории РФ может быть Кавказский регион, где выявлено шесть видов иксодовых клещей, являющихся потенциальными переносчиками вируса в природе [И.А. Бакулов, 1998].

В 1980 г. сотрудниками ВНИИВВиМ был получен аттенуированный мозговой штамм «ММ» вируса БН путем серийного пассирования вирулентного штамма вируса на белых мышах (134 пассажа), активность которого составляла $6,0-6,2 \text{ Ig MicLD}_{50}/\text{cm}^3$. Этот штамм использовался при конструировании мозговой вирусвакцины и изготовлении диагностических ФИТЦ – глобулинов [Сафонов Г.А., Чистов Ю.В., 1985].

В настоящее время при крупномасштабном получении вирусосодержащего сырья для различных целей в качестве чувствительной системы широко применяют перевиваемые культуры клеток, которые используют и при культивировании вируса БН [F.G. Davies, 1977].

1.2. Цель и задачи исследования

Цель работы - адаптация аттенуированного мозгового штамма «ММ» вируса БН к культурам клеток животных различного происхождения, изучение его иммунобиологических свойств, паспортизация и выдача рекомендаций по использованию полученного штамма в НИР и производстве биопрепаратов.

В соответствии с поставленной целью необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить чувствительность культур клеток различного происхождения к мозговому штамму «ММ» вируса БН;
2. Отработать технологию культивирования штамма «ММ» вируса БН в наиболее технологичных перевиваемых культурах клеток;
3. Изучить иммунобиологические свойства культурального штамма вируса БН;
4. Провести паспортизацию культурального штамма и дать рекомендации по его использованию в НИОКР;
5. Определить условия лиофилизации и хранения культурального штамма вируса БН;

6. Отработать режимы инактивации культурального штамма вируса БН теотропином, изготовить на его основе экспериментальные образцы инактивированной вакцины и изучить их иммуногенные свойства.

1.3. Научная новизна работы

1. Получен культуральный штамм «ММ/К-05» вируса БН, размножающийся в первичных и перевиваемых культурах клеток животных различного происхождения;
2. Определены параметры стационарного и роллерного методов культивирования вакцинного штамма «ММ/К-05» вируса БН в наиболее перспективных и технологичных перевиваемых культурах клеток почки сайги (ПС) и почки овцы (ПО);
3. Предложены стабилизаторы для лиофилизации вакцинного штамма «ММ/К-05» вируса БН и определены условия его хранения при различных температурных режимах;
4. Отработаны режимы инактивации культурального вакцинного штамма «ММ/К-05» вируса БН теотропином и изучены антигенные и иммуногенные свойства экспериментальных образцов ГОА-сапониновой и эмульгированной инактивированной вакцины против этой болезни.

1.4. Практическая значимость

1. Вакцинный культуральный штамм «ММ/К-05» вируса БН, полученный в перевиваемой культуре клеток ПС, депонирован в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (инв. №2589).
2. Разработан роллерный метод культивирования вакцинного штамма «ММ/К-05» вируса БН, позволяющий получать в больших объемах вирусосодержащее сырьё с инфекционной активностью - 6,5-7,0 Ig ТЦД₅₀/см³.
3. Культуральный вакцинный штамм «ММ/К-05» вируса БН отвечает требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам, рекомендован для использования при разработке вакцинных и диагностических препаратов и применяется научными подразделениями института при проведении НИР по плану Россельхозакадемии.
4. Отработана схема получения специфической гипериммунной сыворотки к вирусу БН на овцах. Полученная сыворотка с активностью в РН 1:2048 заложена в коллекцию микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ и используется при проведении НИР и диагностических исследованиях.

1.5. Основные положения, выносимые на защиту

1. Адаптация мозгового штамма «ММ» вируса БН к первичным и перевиваемым культурам клеток животных различного происхождения и технологические параметры его культивирования в культурах клеток ПС и ПО.
2. Иммунобиологические характеристики штамма «ММ/К-05» вируса БН, полученного в культуре клеток ПС.
3. Схемы получения гипериммунной специфической сыворотки к вирусу болезни Найроби для идентификации возбудителя и использования в диагностических исследованиях.
4. Результаты изучения экспериментальных образцов инактивированной теотропином ГОА-сапониновой и эмульгированной вакцины, полученной на основе культурального штамма «ММ/К-05» вируса БН.

1.6. Личный вклад

Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Отдельные этапы исследований проводились совместно с к.в.н., с.н.с. Жуковым А.Н. (раздел «Определение антигенной и иммуногенной активности»); к.б.н., с.н.с. Ногоиной И.В. (раздел «Оценка специфичности ФИТЦ-ИГ к вирусу БН»); к.б.н., с.н.с. Анохиной Е.Г. («Изучение иммунного ответа у животных с применением метода иммуноблоттинга»), д.б.н., Пономаревым В.Н. (исследование вируса с помощью электронной микроскопии в разделе «Адаптация штамма «ММ» вируса БН к первичным и перевиваемым культурам клеток»).

Диссертационная работа выполнена в ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии в 2004-2008гг. при проведении НИР по заданиям 01.02.03. и 08.01.03. Межведомственной координационной программы фундаментальных и приоритетных прикладных исследований по научному обеспечению АПК РФ и проекту РФФИ № 07-04-13593.

1.7. Апробация работы

Основные результаты исследований по теме диссертации доложены на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИВВиМ, 2005-2007 гг.; международной научно-практической конференции ГНУ ВНИИЭВ, 2006г.; международной научно-практической конференции ГНУ ВНИТИБП, 2006г.; конференции молодых ученых ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008г.

1.8. Публикации по работе

По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них две статьи – в журналах по перечню ВАК: «Ветеринария», 2007 - № 2. - С. 16-19 и «Ветеринарная патология», 2007 - №4.- С.100-102.

1.9. Объем и структура диссертации

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические предложения. Список использованной литературы включает 48 отечественных и 125 иностранных источников. Диссертация содержит 17 таблиц и 9 рисунков. В приложении представлены 5 документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Вирусы. Вакцинный штамм «ММ» вируса болезни Найроби, в виде лиофилизированной 20% суспензии мозга белых мышей с инфекционной активностью $6,0-6,2 \lg \text{MieLD}_{50}/\text{cm}^3$ – инв.№ 1370; вирулентный штамм «Х» вируса болезни Найроби с инфекционной активностью $4,0 \lg \text{ИД}_{50}/\text{cm}^3$ – инв. № 109; вакцинный штамм «Б-5/96» вируса оспы овец с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{cm}^3$ – инв.№ 2318; вакцинный штамм «45G37/35-К» вируса чумы мелких жвачных с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{cm}^3$ – инв.№2491; штамм «Тапхар» (16-й серотип) вируса блютанга с инфекционной активностью $5,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{cm}^3$ – инв.№1882; вакцинный штамм «ОК/А-04» вируса оспы коз с инфекционной активностью $4,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{cm}^3$ – инв.№ 2588;

Штаммы получали из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ.

Культуры клеток. Для проведения исследований были использованы первично-трипсинизированные и перевиваемые культуры клеток: тестикул ягненка (ТЯ), почки ягненка (ПЯ), почки новорожденного хомячка (ВНК-21/13) – инв.№39, почки овцы (ПО) – инв. № 22, почки сибирского горного козерога (ПСГК) – инв. № 25, почки сайги (ПС) – инв. № 31, почки африканской зеленой мартышки (VERO) – инв. № 44, тестикул поросенка (ППП) – инв. № 10.1., почки зеленой мартышки (CV-1) – инв.№ 43.3, легкого эмбриона оленя (ЛЭО/06)- инв.№ 30.1, кожи эмбриона лося (КЭЛ/07) - № 28, сосудистого сплетения мозга овцы (ССМО)- инв.№ 65, асцитные клетки саркомы Рауса мышей штамм «ТГ 180». Культуры

клеток получали из лаборатории «Культуры клеток с музеем клеточных штаммов» ГНУ ВНИИВВиМ.

Питательные среды, сыворотки, растворы и препараты. Синтетическая среда Игла-МЕМ фирм Sigma, Nu Clon и Nu Media; забуференный физиологический раствор, pH 6,5-7,8; сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС); фетальная сыворотка КРС фирмы Sigma; сыворотки специфические против вирусов чумы мелких жвачных (ЧМЖ), болезни Ауески, болезни Найроби (БН), лихорадки долины Рифт (ЛДР), оспы овец с активностью в реакции нейтрализации (РН) 1:16-1:32; полный альбумин Фрейнда, лактоза (хч), желатин (хч), пептон (хч), обезжиренное молоко, антибиотики (стрептомицина сульфат, бензилпенициллина калиевая (натриевая) соль, гентамицин, нистатин), гепарин, минеральное масло Marcol – 52 (Франция); эмульгатор КЛ-230, препарат теотропин (А-24) и др.

Животные. Клинически здоровые беспородные овцы и козы 3-18 месячного возраста, кролики породы «Шиншилла» живой массой 2,0-3,5 кг, мыши беспородные белые массой 7-8 г и 18-20 г.

Культивирование вируса БН проводили при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ стационарным и роллерным методом в первичных и перевиваемых культурах клеток.

Определение титра вируса. Титр вируса определяли методом последовательных десятикратных разведений в культурах клеток, выращенных в пробирках или на микропанелях и путем интрацеребрального заражения беспородных белых мышей-сосунов. Опыты проводили в трех повторностях. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Определение вируснейтрализующих антител (ВН-антител) к вирусу БН. Уровень ВН-антител определяли в реакции нейтрализации (РН) общепринятым методом с использованием постоянной дозы вируса (1000 ТЦД_{50}) и двукратных разведений сывороток.

Определение стерильности. Контроль стерильности проводили согласно ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Подготовку и оценку тест-препаратов для люминесцентной микроскопии проводили по В.Е. Коростелеву, Е.Н. Левиной (1969). Инфицированную культуру клеток ПС или ПО, выращенную на стеклянных пластинках или на микропанелях, окрашивали специфическим к вирусу БН ФИТЦ-иммуноглобулином.

Покровные стекла на 3-е сутки культивирования вируса извлекали из пробирок и подсушивали на открытом воздухе. Фиксировали охлажденным

ацетоном (хч) в течение 10 минут, высушивали и наносили капли ФИТЦ-иммуноглобулинов к вирусу БН, взятого в рабочем разведении. Стекла инкубировали во влажной камере при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 30 минут. Затем покровные стекла ополаскивали в 0,01 М ФБР рН 7,5 и отмывали в 0,1 М ФБР рН 7,5. Отмывание вели в течение 60 минут в теплом месте при смене ФБР через каждые 20 мин. По окончании отмывания тест-препараты ополаскивали в деминерализованной воде и подсушивали. Препараты заключали в забуференный раствор глицерина для иммунофлуоресцентной микроскопии. Учет результатов проводили в поле зрения люминесцентного микроскопа.

Определение безвредности. Безвредность вируса определяли на овцах и козах при подкожном введении вируса в дозе 4,0-5,0 lg ТЦД₅₀ в объеме 1,0 см³.

Изучение антигенной и иммуногенной активности. Антигенную и иммуногенную активность препаратов определяли через 14-21 сутки после вакцинации овец и коз по титру ВН-антител и результатам их контрольного заражения вирулентным штаммом «Х» вируса БН. Вакцинные препараты считали иммуногенными, если в течение 21 суток после контрольного заражения привитые животные не заболели болезнью Найроби или же в их сыворотках крови обнаруживали ВН-антитела в титрах 1:8 и выше. За одну прививную вакцинирующую дозу (1 ПВД) штамма принимали $10^{3,0}$ ТЦД₅₀ вируса.

Анализ антигенов вируса болезни Найроби методом иммуоблоттинга проводили по методу Laemmli V.K. (1970) в восстанавливающих условиях.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Адаптация штамма «ММ» вируса болезни Найроби к первичным и перевиваемым культурам клеток

Репродуктивную активность мозгового штамма «ММ» вируса БН изучали в культурах клеток различного происхождения: первично-трипсинизированных - ПЯ, ТЯ; перевиваемых – ВНК-21/13, ПО, ПС, ПСГК, VERO, ПТП, ССМО, КЭЛ/07, CV-1, ЛЭО/06. Посевная концентрация для первично-трипсинизированных клеток составляла 300-400 тыс. кл/см³, для перевиваемых-70-250 тыс.кл/см³. В опытах использовали клеточные культуры, выращенные в чашках Карреля, 0,25 дм³ или 1,5 дм³ матрасах общепринятыми методами. Для культивирования культур клеток использовали среду Игла - MEM с добавлением 5-7% сыворотки крови КРС или фетальной сыворотки КРС, вируса – с 2% нормальной и фетальной сыворотки КРС.

Инфицирование культур клеток проводили мозговым штаммом «ММ» вируса БН активностью $6,0 \text{ lg MicLD}_{50}/\text{см}^3$ при заражающей дозе $0,01-0,1 \text{ MicLD}_{50}/\text{кл}$, который культивировали в течение 6 последовательных пассажей.

В первичных культурах клеток ПЯ и ТЯ отмечали цитопатическое действие (ЦПД) через 72-96 часов на уровне 3-4 пассажей с накоплением вируса $3,0-4,5 \text{ lg MicLD}_{50}/\text{см}^3$. В перевиваемой культуре клеток ВНК-21/13 ЦПД и накопление вируса в аналогичных титрах наблюдали только на уровне 4-5 пассажей. В других культурах клеток в течение 6 последовательных пассажей ЦПД вируса не наблюдали. В дальнейших исследованиях для адаптации вируса к перевиваемым культурам клеток использовали полученный в первичной культуре клеток ПЯ вирус 3-го пассажа с активностью $4,0 \text{ lg MicLD}_{50}/\text{см}^3$.

В культурах клеток ПС, ПО, ВНК-21/13 отмечали характерное развитие ЦПД уже во втором пассаже. В культурах клеток VERO, CV-1, ПТП и ПСГК появление ЦПД наблюдали на уровне 3-4 пассажей. В культурах клеток ССМО, КЭЛ/07 и ЛЭО/06 вирус не размножился. Результаты изучения накопления штамма «ММ» вируса БН в культурах клеток на уровне 6 пассажа приведены в табл. 1.

Таблица 1
Накопление штамма «ММ» вируса болезни Найроби в культурах клеток (6 пассаж)
 $n \geq 3$

Культуры клеток	Наличие ЦПД	Титр вируса	
		$\text{lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$	$\text{lg MicLD}_{50}/\text{см}^3$
Первичные культуры клеток			
ПЯ	+	4,0-5,0	4,0-4,5
ТЯ	+	4,5-5,0	3,7-4,0
Перевиваемые культуры клеток			
ПС	+	6,75-7,0	5,8-6,2
ПО	+	6,5-7,0	6,0-6,2
ВНК-21/13	+	6,25-7,0	5,7-6,0
VERO	+	5,75-6,25	н/и
ПСГК	+	5,25-6,0	5,0-5,2
CV-1	+	5,75-6,0	4,8-5,0
ПТП	+	5,0-5,25	н/и

Примечание: + специфическое проявление ЦПД; н/и – не исследовали

В культурах клеток ПС, ПО и ВНК-21/13 титр вируса достигал $6,25-7,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$ и сохранялся на этом уровне в течение 20 последовательных пассажей (срок наблюдения). В клеточных культурах VERO, CV-1, ПСГК, ПТП его накопление было ниже на $1,0-2,0 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Инфекционная активность этих материалов на мышах имела коррелятивную зависимость с титрами, полученными при титровании в культурах клеток, однако их активность на $0,5-1,0 \text{ lg MicLD}_{50}/\text{см}^3$ была ниже.

Цитопатогенное действие через 48 часов в культурах клеток ПС, ПО, ВНК-21/13, ПСГК, ПЯ и ТЯ характеризовалось вначале появлением отдельных округлых клеток, а затем их конгломератов в монослое. Через 72 часа в монослое выявлялись «окна», вокруг которых располагались круглые, преломляющие свет клетки. В дальнейшем (через 96-120 часов) наблюдали разрушение всего монослоя. В культурах клеток VERO, CV-1, ПТП через 48-72 часа культивирования ЦПД вируса характеризовалось округлением клеток и полным разрушением монослоя через 96-120 часов.

Таким образом, в результате проведенных исследований штамм «ММ» вируса БН был адаптирован к первичным (ПЯ, ТЯ) и перевиваемым (ПС, ПО, ВНК 21/13, ПСГК, CV-1, VERO, ПТП) культурам клеток. Наибольшее накопление вируса наблюдали в культурах клеток ПС, ПО и ВНК-21/13, которые были рекомендованы для получения вирусного сырья с высокой активностью.

2.2.2. Оптимизация условий выращивания культурального штамма вируса БН в культурах клеток ПС и ПО

2.2.2.1. Определение оптимальной множественности заражения

Оптимальную дозу заражения культуры клеток культуральным штаммом определяли по уровню накопления вируса. С этой целью 1-2-х суточный монослой клеток, выращенный в чашках Карелля или 1,5 дм³ матрасах, инфицировали вирусом в дозах 0,1, 0,01, 0,001 и 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Культивирование вируса проводили в течение 3-5 суток. Начиная со 2-х суток следили за развитием в клетках специфического ЦПД. В период поражения 70-80% монослоя клеток вирусосодержащую жидкость замораживали при минус (40,0±0,5)°С. Результаты определения накопления вируса в культурах клеток ПС и ПО представлены в табл. 2.

Таблица 2
Влияние множественности заражения на накопление вируса БН

n≥3

Множественность заражения (ТЦД ₅₀ /кл)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)					
	1 пас.		2 пас.		3 пас.	
	ПС	ПО	ПС	ПО	ПС	ПО
0,0001	4,00±0,08	3,75±0,09	2,30±0,09	1,50±0,09	0,00	0,00
0,001	5,70±0,22	5,90±0,22	6,50±0,00	6,25±0,12	7,10±0,09	6,75±0,14
0,01	6,00±0,09	6,17±0,09	6,40±0,09	6,70±0,22	6,90±0,09	6,17±0,09
0,1	5,42±0,09	5,25±0,14	4,75±0,00	4,81±0,44	4,25±0,14	3,41±0,22

Как видно из табл. 2, оптимальная доза заражения находится в интервалах значений 0,001 – 0,01 ТЦД₅₀/кл, тогда как более низкая множественность приводила к снижению уровня накопления вируса, вследствие интенсивной пролиферации клеток (клетки монослоя образовывали второй слой). Более

высокая множественность заражения (0,1 ТЦД₅₀/кл) приводила к снижению титра вируса в последующих пассажах.

2.2.2.2. Влияние концентрации сыворотки КРС на накопление вируса

При инфицировании культур клеток использовали оптимальную заражающую дозу вируса – 0,01 ТЦД₅₀/кл. Содержание сыворотки КРС в поддерживающей среде Игла - МЕМ составляло 1,0; 2,0; 5,0 и 10,0%.

Результаты опытов представлены в табл.3.

Таблица 3
Влияние концентрации сыворотки КРС на накопление вируса БН

Культура клеток	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)				
	0,0 %	1,0 %	2,0 %	5,0 %	10,0 %
ПС	4,50±0,08	5,83±0,17	6,75±0,14	5,70±0,22	4,70 ±0,44
ПО	4,25±0,14	5,42±0,09	6,50±0,09	5,00 ±0,10	4,20±0,10

Как видно из табл. 3, при выращивании штамма «ММ» вируса БН в культурах клеток ПС и ПО оптимальная концентрация сыворотки крови КРС в питательной среде Игла - МЕМ составляла 2,0 %, накопление вируса было в пределах 6,5-6,75 lg ТЦД₅₀/см³. Содержание в поддерживающей среде более низких или высоких концентраций сывороток приводило к снижению титра вируса на 1,0-2,55 lg ТЦД₅₀/см³.

2.2.2.3. Влияние pH среды Игла-МЕМ на накопление вируса БН

При изучении влияния pH среды на накопление культурального вируса использовали среду Игла-МЕМ с различной концентрацией водородных ионов (pH - 6,5-7,8). Множественность заражения составляла 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл. Время культивирования 2-4 суток при температуре (37,0±0,5)°С. Результаты опыта приведены в табл. 4.

Таблица 4
Влияние pH среды Игла-МЕМ на накопление вируса БН

Доза заражения (ТЦД ₅₀ /кл)	pH	Длительность культивирования (сут)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)	
			ПС	ПО
0,01	6,5-7,0	3	4,41±0,09	4,50±0,00
	7,0-7,4	2-3	7,10±0,09	6,90±0,22
	7,4-7,8	3-4	5,80±0,17	5,70±0,44

Как видно из табл. 4, максимальное накопление вируса БН в культурах клеток ПС и ПО наблюдали при pH 7,0-7,4 поддерживающей среды. При более высоких и низких значениях pH урожай вируса был ниже на 1,4 – 2,7 lg ТЦД₅₀/см³, а время культивирования было больше на одни сутки.

Таким образом, рН поддерживающей среды Игла-МЕМ в пределах 7,0-7,4 является оптимальной и обеспечивает накопление вируса в культурах клеток ПС и ПО в титрах 6,9-7,1 lg ТЦД₅₀/см³.

2.2.3. Разработка роллерной технологии культивирования вируса БН

В настоящее время широко используется роллерная технология получения высокоактивного культурального вирусосодержащего материала [В. А. Сергеев, 1993; В. И. Бальшева и др., 2002].

Обработку роллерной технологии культивирования культурального штамма проводили в культурах клеток ПС и ПО, выращенных в сосудах объемом 3,0 дм³, так как в настоящее время эти культуры клеток используются во ВНИИВВиМ при изготовлении живых вирусвакцин. При этом учитывали параметры выращивания вируса в 1,5 дм³ матрасах: множественность заражения – 0,01-0,001 ТЦД₅₀/кл, рН среды - 7,0-7,4, поддерживающая среда Игла-МЕМ, содержащая 2,0% сыворотки КРС, температурный режим – (37,0±0,5)°С, продолжительность культивирования – 2-4 суток. Объем заполнения роллерных бутылей составлял 0,5 дм³, скорость вращения бутылей - 12-16 об/час. Результаты получения трех серий вирусосодержащего материала роллерным методом приведены в табл.5.

Таблица 5
Культивирование вируса БН в культуре клеток ПС роллерным методом
n≥3

Номер серии	Кол-во роллерных бутылей	Доза вируса (ТЦД ₅₀ /кл)	Длит-ть культ. (сут.)	Объем серии (дм ³)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /см ³)
1	4	0,001	3-4	2,0	7,16±0,09
2	4	0,005	3-4	2,0	7,20±0,14
3	4	0,01	2-3	2,0	6,75±0,14

Как видно из табл.5, при указанных параметрах культивирования титр вируса составлял 6,75 – 7,2 lg ТЦД₅₀/см³. При выращивании вируса в культуре клеток ПС в среде Игла-МЕМ, содержащей 2,0% фетальной сыворотки КРС, его накопление было на 0,5 lg выше, чем при культивировании с обычной сывороткой.

Аналогичные результаты культивирования штамма «ММ» вируса БН были получены и в культуре клеток ПО.

2.2.4. Определение специфичности культурального вируса БН

2.2.4.1. Определение специфичности вируса в реакции нейтрализации (РН)

Видовую специфичность штамма вируса определяли в РН по общепринятой методике в перевиваемой культуре клеток ПС в присутствии специфической, нормальной и гетерологичных сывороток с 1000 ТЦД₅₀ вируса. Специфические сыворотки получали из коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ. Результаты опыта приведены в табл. 6.

Определение специфичности культурального штамма вируса БН

Компоненты реакции	Разведение сывороток						Титр
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
SS к вирусу БН + вирус БН	----	----	----	----	----	++++	1:32
SS к вирусу ЧМЖ + вирус БН	++++	++++	++++	н/и	н/и	н/и	----
SS к вирусу оспы овец + вирус БН	++++	++++	++++	н/и	н/и	н/и	----
SS к вирусу ЛДР + вирус БН	++++	++++	++++	++++	н/и	н/и	----
SS к вирусу б. Ауески + вирус БН	++++	++++	++++	н/и	н/и	н/и	----
SS к вирусу оспы коз + вирус БН	++++	++++	++++	н/и	н/и	н/и	----
Нормальная сыв-ка + вирус БН	++++	++++	++++	н/и	н/и	н/и	----

Примечания: SS – специфическая сыворотка; н/и - не исследовали;
«+» - наличие ЦПД; «-» - отсутствие ЦПД

Как видно из табл. 6, специфическая сыворотка к вирусу БН в разведении 1:32 предотвращала развитие характерного ЦПД, вызываемого культуральным вирусом в зараженной культуре клеток ПС. Нормальная и гетерологичные сыворотки не нейтрализовали изучаемый вирус. Полученные результаты подтверждают принадлежность адаптированного к культуре клеток ПС штамма «ММ» к вирусу БН.

2.2.4.2. Определение специфичности вируса в реакции прямой иммунофлуоресценции (РПИФ)

Специфичность вируса подтверждали окрашиванием инфицированной культуры клеток ПС диагностическим ФИТЦ-глобулином.

В инфицированных клетках через 24-48 часов при просмотре под люминесцентным микроскопом наблюдали специфическое свечение телец-включений в виде гранул и полуколец в перинуклеарной зоне цитоплазмы. В то же время в контрольной культуре клеток специфического свечения не отмечали.

2.2.5. Изучение иммунобиологических свойств культурального вируса БН

Безвредность, антигенную и иммуногенную активность штамма «ММ» вируса БН, полученного в культуре клеток ПС (9 пассажей), определяли на овцах и козах, привитых разными дозами вируса. С учетом имеющихся сведений за одну прививную вакцинирующую дозу штамма (ПВД) принимали 1000 ТЦД₅₀ вируса [M.P. Weinbren, 1958; F.G. Davies, 1977].

2.2.5.1. Определение безвредности

Безвредность штамма определяли на 6 овцах и 1 козе 6-18 месячного возраста, которым подкожно в область внутренней поверхности бедра в объеме 1,0 см³ вводили вирусосодержащий материал в дозе 5,0 (100 ПВД) и

4,0 (10 ПВД) lg ТЦД₅₀ вируса. За привитыми животными вели наблюдение в течение 21 суток с ежедневной термометрией.

На 6-11 сутки после иммунизации у опытных овец и коз в течение 2-3 суток наблюдали повышение температуры тела до 40,7°C. Других клинических признаков болезни (угнетение, диарея, отказ от корма) не наблюдали, что указывает на безвредность штамма для овец и коз при введении вируса в дозе 5,0 и 4,0 lg ТЦД₅₀.

У животных через 21 сутки после иммунизации отбирали пробы крови для определения в их сыворотках уровня ВН-антител, титр которых составлял 1:32.

2.2.5.2. Определение антигенной и иммуногенной активности

Оценку антигенной и иммуногенной активности культурального вируса проводили по уровню накопления ВН-антител в сыворотках крови 5 овец и 3 коз, привитых в дозах 2,0 (0,1 ПВД) и 3,0 (1 ПВД) lg ТЦД₅₀, и по результатам их контрольного заражения, освеженным вирулентным штаммом «Х» вируса БН. Результаты исследований представлены в табл. 7.

На 4-10 сутки после прививки у животных отмечали повышение температуры тела до 40,6°C в течение 1-3 суток. Клинические признаки болезни Найроби у животных отсутствовали. Титры ВН-антител у овец и коз, привитых в дозе 3,0 lg ТЦД₅₀/см³, на 21 сутки составляли 1:16-1:32, а у животных, привитых в дозе 2,0 lg ТЦД₅₀/см³, титры ВН-антител были ниже-1:4-1:8.

Таблица 7

Антигенная и иммуногенная активность вируса БН

Группы жив-х	Прививная доза (lgТЦД ₅₀)	Реакция на вакцинацию		Титр ВН-антител		Результаты контрольного заражения	
		длит. р-ии (сут.)	макс. темп. (°С)	14 сут	21 сут	пало/заражено	Клинические проявления
1	2,0 (0,1 ПВД)	1-3	40,6	1:4	1:4-1:8	0/4	У двух овец на 4-9 сут угнетение, подъем t° тела до 40,7-41,1°C
2	3,0 (1 ПВД)	1-2	40,5	1:8-1:16	1:16-1:32	0/4	У двух ж-х подъем на 4-5 сутки t° тела до 40,3 - 40,5°C
3	Контроль	-	-	-	-	2/2	Угнетение, диарея с примесью крови, на 6-14 сут t° тела до 41,7 - 41,9°C. На 15 и 17 сутки гибель.

Примечание: - не исследовали.

Контрольное заражение животных проводили вирулентным штаммом «Х» вируса БН на 21-е сутки после иммунизации внутримышечно в дозе 1000 ЛД₅₀. За зараженными животными вели наблюдение в течение 30 суток. У двух животных, привитых в дозе 2,0 lg ТЦД₅₀, содержащих в сыворотках крови ВН-антитела в титрах 1:4, на 4-9 сутки наблюдали угнетение и подъем температуры тела до

40,7-41,1°C. Других клинических проявлений болезни у животных в течение всего периода наблюдения не отмечали. Контрольные коза и овца погибли на 15 и 17 сутки после заражения с характерными клиническими признаками болезни Найроби.

Таким образом, штамм «ММ» вируса БН, адаптированный к культуре клеток ПС, при подкожном введении животным в дозах 2,0 и 3,0 Ig ТЦД₅₀ вызывал на 21 сутки после иммунизации образование ВН-антител в титрах 1:4-1:8 и 1:16-1:32 соответственно и защищал их при контрольном заражении вирулентным вирусом.

2.2.5.3. Изучение гематологических показателей

Исследования проводили на овцах и козах 3-12 мес. возраста, которых иммунизировали вирусом в дозах 1000 и 10000 ТЦД₅₀. Изучение гематологических изменений у животных вели в течение 30 суток после прививки. Результаты опыта представляли в виде % по отношению к уровню содержания клеток до иммунизации.

У животных, иммунизированных культуральным вирусом в дозе 10000 ТЦД₅₀, на 3-7-е сутки отмечали снижение количества клеток белой крови на 15,2-20,1% с последующим восстановлением до нормы (к 30-м суткам). В течение всего периода наблюдения отмечали незначительный лимфоцитоз в пределах 5,0-12,9%.

Общее количество лейкоцитов и лимфоцитов у животных, иммунизированных в дозе 1000 ТЦД₅₀, на 7 сутки увеличилось на 7,6% и 6,0% соответственно, а к 30-м суткам наблюдения восстановилось до исходных значений.

Наиболее выраженные изменения наблюдали со стороны нейтрофилов, количество которых на 7 сутки увеличивалось на 30,8-36,4% в обеих группах. Наиболее длительная нейтрофилия (до 21 суток) наблюдалась у животных, привитых вирусом в дозе 1000 ТЦД₅₀, что, по-видимому, связано с наличием в этой группе молодых животных (3-х месячного возраста).

Отмечаемая нейтрофилия с небольшим регенеративным сдвигом влево, т.е. появление большого количества молодых нейтрофилов (примиелоцитов, миелоцитов и палочкоядерных нейтрофилов), указывает на активную выработку этих клеток миелоидной системой, а также репродукцию вируса в организме животных. Общее количество моноцитов и эозинофилов существенно не изменялось и находилось в пределах физиологической нормы.

Полученные результаты исследований позволяют сделать вывод о том, что изменения гематологических показателей зависят от вводимой дозы вируса болезни Найроби, а также возраста животных.

2.2.5.4. Изучение иммунного ответа у животных с применением метода иммуноблоттинга

В экспериментах по изучению иммунного ответа у овец на введение адаптированного к культуре клеток ПС штамма «ММ» с использованием метода иммуноблоттинга применяли:

- специфический антиген, представляющий собой лизат клеток ПС, зараженных вирусом БН;
- лизат интактных клеток ПС;
- лиофилизированную иммуно-асцитическую жидкость мышей, полученную на вирулентный штамм «Х» вируса БН;
- сыворотки крови привитых овец, взятые в разные сроки.

Разделенные методом электрофореза в 7,5% и 10%-ном ДСН-ПААГ фракции полипептидов переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали с антителами иммуно-асцитической жидкости мышей (разведение 1:500) или сывороток овец (разведение 1:200). Выявление образовавшихся комплексов антиген-антитело проводили пероксидазным конъюгатом кроличьих антимышиных IgG (разведение 1:400), агглювечных IgG (разведении 1:2000) и пероксидазным конъюгатом протеина А (разведении 1:2000).

В результате исследования в препарате специфического антигена инкубированного с иммуно-асцитической жидкостью мышей, полученной на вирулентный штамм «Х», выявили белки с молекулярной массой 47-55, 45, 41, 39, 35 кДа.

Установлено, что через 7 суток после иммунизации культуральным штаммом в сыворотках крови овец присутствуют антитела, взаимодействующие с вирусными белками молекулярной массы 35, 39, 41, 47-55 и 72 кДа. Белки с молекулярной массой 72, 47-55 и 41 кДа соответствуют структурным белкам G2, N и G1 этого возбудителя, описанным в литературе [J.P. Clerx et al., 1981; R.M. Elliott et al., 1991]. На 14 и 21 сутки также выявляли белки с этой молекулярной массой, что свидетельствует об индукции специфических антител к вирусу БН.

2.2.5.5. Определение реверсibilityности

С целью изучения реверсibilityности проводили пять последовательных пассажей полученного культурального штамма вируса БН на ягнятах 6-8 месячного возраста. При проведении первого пассажа ягнisku подкожно вводили вирус в дозе 5,0 Ig ПЦД₅₀ (100 ПВД) в объеме 1,0 см³. На 7-е сутки у ягненка отбирали кровь и вводили её в том же объеме следующему животному (второй пассаж). Аналогично проводили еще три последующих пассажа. За животными вели ежедневное

наблюдение с проведением термометрии. Клинические признаки болезни Найроби у животных в течение всего срока наблюдения отсутствовали. Это свидетельствует о том, что адаптированный к перевиваемой культуре клеток ПС штамм «ММ» вируса БН является не реверсидельным.

Таким образом, согласно полученным иммунобиологическим характеристикам, адаптированный к перевиваемой культуре клеток ПС вирус отвечал требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам, и был паспортизирован как вакцинный штамм «ММ/К-05» вируса БН. Штамм заложен в коллекцию микроорганизмов института под инв. № 2589 и рекомендован для разработки культуральной вирусвакцины против этой болезни.

2.2.6. Определение условий лиофилизации и хранения культурального штамма «ММ/К-05» вируса БН

2.2.6.1. Подбор стабилизатора

Культуральный штамм «ММ/К-05» лиофилизировали под вакуумом с тремя стабилизаторами: лактозо (4,0%) – пептонным (10,0%), лактозо (10,0%) – пептоно (5,0%) - желатиновым (1,0%) и обезжиренным молоком. Результаты изучения этих образцов вируса в течение 12 месяцев хранения представлены в табл.8.

Как видно из табл. 8, лиофилизированный под вакуумом с лактозо (4,0%) - пептонным (10,0%) и лактозо (10,0%) – пептоно (5,0%) – желатиновым (1,0%) стабилизатором культуральный штамм «ММ/К-05» сохранял исходную активность в течение 12 месяцев хранения при температуре $(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$. В материалах, лиофилизированных с обезжиренным молоком, титр снижался на $0,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. В то же время инфекционная активность трех лиофилизированных образцов оставалась на исходном уровне в течение 12 месяцев хранения при температуре минус $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$.

Таблица 8

Сохраняемость лиофилизированного штамма «ММ/К-05» вируса БН различными стабилизаторами $n \geq 3$

№ п/п	Применяемый стабилизатор	Титр вируса ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$)		
		Исходный	Через 12 мес. хранения	
			Минус $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$	$(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$
1.	лактозо (4,0%) – пептонный (10,0%)	6,5	$6,51 \pm 0,09$	$6,35 \pm 0,14$
2.	обезжиренное молоко	6,0	$6,00 \pm 0,10$	$5,5 \pm 0,25$
3.	лактозо(10,0%)– пептоно(5,0%)- желатиновый (1,0%)	6,25	$6,25 \pm 0,14$	$6,15 \pm 0,14$

С учетом полученных результатов для лиофилизации культурального штамма «ММ/К-05» вируса БН были рекомендованы лактозо (4,0%) - пептонный (10,0%) и лактозо(10,0%)-пептоно(5,0%)-желатиновый (1,0%) стабилизаторы, что нашло отражение в разработанном нами СТО на этот штамм.

2.2.6.2. Изучение сохраняемости нативного и лиофилизированного штамма при различных температурах

Изучение сохраняемости нативного и лиофилизированного с лактозо (4,0%) – пептонным (10,0%) стабилизатором вирусосодержащего материала проводили в течение 24 месяцев при температурах (37,0±0,5)°С, (18,0±2,0)°С, (4,0±2,0)°С и минус (40,0±0,5)°С. Титр исходного нативного и лиофилизированного вируса составлял 6,5 lg ТЦД₅₀/см³.

Результаты изучения устойчивости нативного и лиофилизированного вируса в течение 2-х лет хранения при различных температурах приведены в табл. 9.

Таблица 9

Изучение сохраняемости культурального штамм «ММ/К-05» вируса БН

Темпер. режим (°С)	Испытуемый материал	Титр вируса при хранении (lg ТЦД ₅₀ /см ³)					
		1 мес.	2 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.
Минус 40,0±0,5	Натив.	6,51±0,09	н/и	6,48±0,09	6,45±0,09	5,4±0,09	3,75±0,22
	Лиоф.	6,51±0,09	н/и	6,51±0,09	6,51±0,09	6,45±0,09	6,50±0,00
4,0±2,0	Натив.	1,50±0,09	0,50±0,00	-	н/и	н/и	н/и
	Лиоф.	6,51±0,09	6,51±0,09	6,50±0,00	6,45±0,00	6,45±0,14	3,51±0,44
18,0±2,0	Натив.	-	-	н/и	н/и	н/и	н/и
	Лиоф.	5,40±0,09	5,00±0,10	5,00±0,10	4,20±0,09	2,10±0,20	-
37,0±0,5	Натив.	-	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
	Лиоф.	-	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и

Примечание: н/и – не исследовали; – - вирус не обнаруживали.

Нативный культуральный вирусосодержащий материал при температуре минус (40,0±0,5)°С снижал титр через 24 месяца хранения на 2,75 lg ТЦД₅₀/см³. В то же время при (18,0±2,0)°С и (37,0±0,5)°С вирус уже инактивировался в течение 14 суток, а при (4,0±2,0)°С через 3 месяца.

Лиофилизированный вирус при температуре (4,0±2,0)°С снижал активность на 3,0 lg ТЦД₅₀/см³ в течение срока наблюдения. При температуре (18,0±2,0)°С через 12 месяцев титр снижался до 2,0 lg ТЦД₅₀/см³, а при температуре (37,0±0,5)°С он инактивировался в течение 21 суток.

Полученные данные свидетельствуют о слабой устойчивости нативного культурального вируса БН, что согласуется с литературными данными.

2.2.7. Получение специфической ВН-сыворотки к вирусу БН

Своевременность и точность диагностических исследований определяется наличием специфической ВН-сыворотки, которая применяется как при диагностике инфекционных болезней животных, так и при идентификации микроорганизмов различных таксономических групп. Опыты по получению специфической сыворотки проводили на овцах 8-10 месячного возраста и кроликах породы «Шиншилла» массой 3,0-3,5 кг.

Для иммунизации животных использовали культуральный штамм «ММ/К-05» в виде нативного и эмульгированного с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1, концентрированного вирусосодержащего материала, а также вирулентный штамм «Х» вируса БН. Результаты этих исследований представлены в табл. 10.

Таблица 10

Результаты получения специфических ВН-сывороток к вирусу БН

№ п/п	Схема иммунизации	Интервал (сутки)	Метод введения и объем	Вид жив-х	Кл-во ж-х	Титр ВН-антител
1.	1-я иммунизация - нативный культур. вирус в дозе 6,0 lg ТЦД ₅₀ ; 2-, 3-, 4-я - эмульгир. культур. концентр. вирус, в дозе 7,5 lg ТЦД ₅₀ ;	14	п/к 1,0 см ³	ягнота	2	1:256-1:512
				кролики	4	1:32-1:64
2.	1-, 2-я иммунизация - эмульгир. культур. вирус в дозе 6,0 lg ТЦД ₅₀ ; 3- 9-я - нативным культур. вирусом в дозе 3,0 lg ТЦД ₅₀ ;	14	в/м 1,0 см ³	кролики	4	1:64-1:128
		2	в/в 0,5 см ³			
3.	1-я иммунизация: культур. штамм «ММ/К-05» в дозе 2,0 lg ТЦД ₅₀ ; 2-я - вирулентный штамм «Х» в дозе 3,0 lg ЛД ₅₀	21	п/к 1,0 см ³ в/м 1,0 см ³	овцы	2	1:1024- 1:2048

Примечание: в/м-внутримышечно; в/в-внутривенно; п/к-подкожно.

Было показано, что более высокие титры ВН-антител были получены на иммунизированных ягнятах (1:256-1:512) по сравнению с лабораторными животными - кроликами (1:32-1:128). ВН-антитела в титрах 1:1024-1:2048 получали в сыворотках крови овец, иммунизированных вначале вакцинным штаммом «ММ/К-05», а затем вирулентным штаммом «Х» вируса БН. Эта сыворотка была использована для получения диагностического ФИТЦ-глобулина, а также лиофилизирована и заложена в музей микроорганизмов института.

Учитывая, что для производства диагностических ФИТЦ-глобулинов при БН используют иммуно-асцитическую жидкость (ИАЖ) белых мышей, полученную на основе мозгового штамма «ММ», аналогичная работа была проведена с использованием штамма «ММ/К-05», полученного в культуре клеток ПС.

Для иммунизации использовали 10 % суспензию освеженного мозгового штамма «ММ» и вирусосодержащий культуральный материал с активностью $5,8 \lg \text{MLD}_{50}/\text{см}^3$ и $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. В опыте использовали белых беспородных мышей массой 18-20 г по 20 голов на каждый образец материала. Интервал между иммунизациями составлял 14 суток. ИАЖ получали путем 4-х кратного внутривентрального введения вирусосодержащего материала. Вторую и третью иммунизацию проводили эмульгированным полным адьювантом Фрейнда вирусом. Индуктором асцитобразования являлись клетки саркомы Рауса (штамм «ТГ 180»). Титры ВН-антител в асцитической жидкости мышей, иммунизированных культуральным и мозговым вирусосодержащим материалом, существенно не отличались и составляли 1:64-1:128 и 1:32-1:128 соответственно.

Таким образом, для практического использования предложены две схемы получения специфической к вирусу БН сыворотки овец с использованием вакцинного, а также вакцинного и вирулентного штаммов вируса БН, активность которых в РН составляет 1:256-1:512 и 1:1024-1:2048 соответственно.

2.2.8. Оценка специфичности ФИТЦ-иммуноглобулинов к вирусу БН

Диагностический ФИТЦ-иммуноглобулин готовили по общепринятой методике, описанной В.Е. Коростелевым, Е.Н. Левиной (1969).

Специфичность меченых ФИТЦ-ИГ, полученных из гипериммунной сыворотки овцы, определяли по наличию характерного свечения окрашенных антигенов штамма «ММ/К-05» вируса БН в инфицированной культуре клеток ПС, выращенной на стеклянных пластинах, и в мазках-отпечатках органов, павших после контрольного заражения овец вирулентным вирусом. В качестве контрольных препаратов использовали культуры клеток, инфицированных штаммами «Б-5/96» вируса оспы овец, «45G37/35-К» вируса чумы мелких жвачных, «Тапхар» вируса блютанга, «ОК/А-04» вируса оспы коз, а также мазки-отпечатки органов не привитых овец.

При просмотре под люминесцентным микроскопом культур инфицированных вирусом БН клеток и мазков-отпечатков органов (селезенка, печень, лимфоузлы) обнаруживали свечение в виде глыбок и полуколец перинуклеарной зоны клетки, в то время как в контрольных образцах свечения не отмечали. Аналогичное свечение наблюдали в клетках, окрашенных ФИТЦ-глобулином, полученном на основе ИАЖ мышей. В контрольных препаратах специфического свечения не отмечали.

2.2.9. Изготовление экспериментальных образцов инактивированной вакцины против БН и изучение её антигенной и иммуногенной активности

2.2.9.1 Отработка режимов инактивации культурального вируса БН

В ГНУ ВНИИВВиМ при производстве инактивированных вакцин широко применяется теотропин (А-24) – химическое соединение группы азаадамантанов. В связи с этим, концентрацию инактиванта для вируса БН подбирали с учетом литературных данных по инактивации вирусов других таксономических групп [С.А. Дудников и др., 1995; И.Ф.Вишняков и др., 1998; В. И. Балышева и др., 2002].

Инактивацию вирусосодержащего культурального материала, полученного на основе штамма «ММ/К-05» вируса БН с активностью $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ проводили теотропином в конечных концентрациях 0,1%; 0,05% и 0,01%. Материал инактивировали при температурах $(18,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ и $(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$.

Полноту инактивации штамма «ММ/К-05» вируса БН определяли через 6, 12, 24 и 48 часов инкубирования путем проведения пяти последовательных пассажей инактивированного материала в культуре клеток ПС.

Результаты опыта представлены в табл. 11.

Таблица 11

Результаты инактивации штамма «ММ/К-05» вируса БН теотропином

№ п/п	Температура (°C)	Концентрация теотропина (%)	Титр вируса в материале ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$)				
			Исх.	6 ч	12 ч	24 ч	48 ч
1	18,0±2,0	0,01	6,01±0,09	4,51±0,09	3,31±0,09	2,00±0,10	-
		0,05		3,54±0,09	1,80±0,17	-	-
		0,1		-	-	-	-
2	4,0±2,0	0,01	6,01±0,09	4,10±0,20	2,41±0,09	1,3±0,09	-
		0,05		3,00±0,01	1,25±0,14	-	-
		0,1		-	-	-	-

Примечание: -- вирус не выделен

Как видно из табл. 11, теотропин в концентрациях 0,01% при температурах $(18,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ и $(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ полностью инактивировал вирус через 48 часов, а в концентрации 0,05% - через 24 часа. В концентрации 0,1% препарат обладал высокой токсичностью для культуры клеток ПС, что затрудняло выделение вируса в испытуемых материалах.

2.2.9.2. Конструирование экспериментальных образцов инактивированной вакцины и изучение её антигенных и иммуногенных свойств

Для приготовления экспериментальных образцов вакцины использовали вирусосодержащий культуральный материал с активностью $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, который инактивировали теотропином в концентрации 0,05% при температуре

($4,0 \pm 2,0$)°C. Время инактивации вируса составляло 36 часов, т.е. на 12 часов больше необходимого для его полной инактивации.

Первый образец препарата готовили смешиванием вирусосодержащего материала и адьюванта (6,0% раствор гидроокиси алюминия (ГОА) и сапонин 1,0%) в соотношении 4:1. Второй образец получали путем эмульгирования вирусосодержащего материала (аа) с адьювантом (минеральное масло Marcol-52 – 95% и эмульгатор КЛ-230 – 5%).

Приготовленными образцами прививали подкожно в подмышечную область четыре группы овец 6-18 месячного возраста (по 2 головы на каждую дозу препарата).

Первую и вторую группу животных иммунизировали однократно в объеме $3,0 \text{ см}^3$. Третью и четвертую группу животных иммунизировали этими же препаратами двукратно с интервалом в 14 суток. Сорбированную вакцину вводили овцам в объемах 2,0; 3,0; $4,0 \text{ см}^3$; эмульгированную - в объеме $2,0 \text{ см}^3$.

Перед контрольным заражением у опытных овец отбирали пробы крови для определения в их сыворотках ВН-антител. Через 30 суток после иммунизации опытных и контрольных овец заражали внутримышечно вирулентным вирусом болезни Найроби в дозе 1000 ЛД₅₀. Результаты опыта представлены в табл. 12.

Как видно из таблицы, при введении одинаковых доз препарата более высокие титры ВН-антител были в сыворотках крови овец, привитых двукратно эмульгированными образцами вакцины. У животных, привитых этими же препаратами однократно титры ВН-антител были ниже, и составляли через 28 суток после иммунизации 1:4-1:8. Привитые животные оставались клинически здоровыми в течение всего срока наблюдения.

После контрольного заражения у овец, привитых ГОА-сапониновой вакциной однократно в дозе $3,0 \text{ см}^3$ и двукратно в дозе $2,0 \text{ см}^3$, на 4-8-е сутки отмечали угнетение и повышение температуры до 40,7-41,1°C. У овец третьей группы, которым вводили препарат в дозе $2,0 \text{ см}^3$, отмечали повышение температуры тела на 4-6 сутки до 40,7-41,0°C. Других клинических признаков, характерных для болезни Найроби, у этих животных не наблюдали. Овцы второй и четвертой группы, иммунизированные эмульгированными препаратами, не реагировали на заражение вирулентным вирусом. Контрольные животные погибли на 9 и 11 сутки с признаками, характерными для острой формы БН.

Иммуногенные свойства экспериментальных образцов инактивированной вакцины против БН

№ гр.	Форма вакцины	Кратность вакцинации	Доза (см ³)	Титр ВН-антител		Реакция на контрольное заражение
				14 сут	28 сут	
1	Сорбированная (ГОА-сапониновая)	однократно	3,0	1:2	1:4	Угнетение, повышение t° на 5-8 сут до 40,8-41,1°C
2	Эмульгированная		3,0	1:4	1:8	Отсутствовала
3	Сорбированная (ГОА-сапониновая)	Двукратно через 14 сут	2,0	1:2-1:4	1:4	Повышение t° на 4-6 сут до 40,7-41,0°C
4	Эмульгированная		3,0	1:8	1:8	Отсутствовала
			4,0	1:8	1:16	
		2,0	1:8	1:16	Повышение t° на 5-6-е сут до 40,0-40,2°C	
5	Контроль	-	-	-	Диарея с примесью крови, повышение t° тела до 41,5-41,9°C. Гибель на 9 и 11 сут	

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об иммуногенности экспериментальных образцов вакцины, изготовленных на основе культурального штамма «ММ/К-05» вируса БН, инактивированного теотропином, которые защищают овец от контрольного заражения вирулентным вирусом БН. Наиболее иммуногенным являлся эмульгированный инактивированный препарат при двукратном введении.

Полученные данные могут быть использованы для разработки инактивированной вакцины против болезни Найроби на основе культурального вакцинного штамма «ММ/К-05» этого возбудителя.

3. ВЫВОДЫ

1. Определена чувствительность 12 культур клеток гомологичного и гетерологичного происхождения к мозговому вакцинному штамму «ММ» вируса болезни Найроби. Наибольшей вирусрепродуцирующей активностью обладали перевиваемые культуры клеток ПС, ПО и ВНК-21/13, в то же время в культурах клеток ССМО, КЭЛ/07, ЛЭО/06 вирус не размножался.
2. Отработаны оптимальные параметры выращивания штамма «ММ» вируса БН в перевиваемых культурах клеток ПС и ПО при стационарном и роллерном методах культивирования, при которых накопление вируса составляло 6,5-7,0 lg ТЦД₅₀/см³.
3. Установлено, что культуральный штамм «ММ» вируса БН, выращенный в перевиваемой культуре клеток ПС, безвреден, слабореактогенен для овец и коз, не реверсибелен, вызывает на 14-21 сутки образование ВН-антител у иммунизированных животных в титрах 1:8-1:32 и предохраняет их от заболевания при заражении вирулентным вирусом.

4. Адаптированный к перевиваемой культуре клеток ПС мозговой штамм «ММ» вируса БН, на уровне 9-го пассажа паспортизирован как вакцинный штамм «ММ/К-05» и заложен в коллекцию микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (инв.№2589).
5. Методом иммуноблоттинга установлено, что на 7 сутки после иммунизации овец штаммом «ММ/К-05» вируса БН в сыворотках крови животных выявляются антитела к вирусным белкам с молекулярной массой 35, 39, 41, 47-55 и 72 кДа.
6. Оптимальной температурой хранения нативного штамма «ММ/К-05» вируса БН является температура минус $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, тогда как при $(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ полная инаktivация вируса наступала через 3 месяца, а при $(18,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ и $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ – через 14 суток. Лиофилизированный с лактозо-пептоиным стабилизатором вирус сохранял исходную активность в течение 24 и 12 месяцев при температурах минус $(40,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и $(4,0 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ соответственно.
7. Отработан режим инаktivации культурального штамма «ММ/К-05» вируса БН теотропином. Экспериментальные образцы инаktivированной эмульгированной и ГОА-сапониновой вакцины при двукратной иммунизации овец индуцировали образование в сыворотках крови ВН-антител в титрах 1:8-1:16 и защищали их от заражения вирулентным вирусом.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического применения предложены:

1. Вакцинный культуральный штамм «ММ/К-05» вируса болезни Найроби, прошедший с положительным результатом комиссионные испытания, депонирован в коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ (№ 2589) и рекомендован для научно-исследовательских целей и разработки вакцинных и диагностических препаратов (акт от 14.02.07г. утвержден директором института);
2. Стандарт ГНУ ВНИИВВиМ на культуральный вакцинный штамм «ММ/К-05» вируса болезни Найроби (СТО 00495549-0059-2008);
3. Способы получения специфической к вирусу БН сыворотки для идентификации возбудителя болезни и проведения диагностических исследований.
4. Вирулентный штамм «Х» вируса болезни Найроби и специфическая сыворотка к вирусу болезни Найроби с активностью в РН 1:2048 заложены в коллекцию микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ для использования в НИР, диагностических исследованиях и производстве биопрепаратов.

Список опубликованных работ по материалам диссертации

1. **Румянцева, Е.А.** Болезнь Найроби (обзор литературы) /Е.А. Румянцева// Сибирская язва и другие опасные инфекционные болезни животных: материалы по теме работы круглого стола, приуроченного к 80-летию академика РАСХН Бакулова И.А., 15-16 августа 2005 г./ГНУ ВНИИВВиМ.–Покров,2005.-С.173-179.
2. Изучение культуральных свойств вируса болезни Найроби /**Е.А. Румянцева**, В.М. Балышев, Л.И. Анисимова, И.В. Ногина// Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов, и возбудителей опасных инфекционных заболеваний: материалы Междунар. симпозиума / ФГНУ ВНИВИ.- Ч.II. - Казань. 2005.- С.289-292.
3. Получение аттенуированного культурального штамма «ММ» вируса болезни Найроби и изучение его иммунобиологических свойств /**Е.А.Румянцева**, В.М. Балышев, А.Н. Жуков, Ю.Ф. Калантаенко// Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: материалы Междунар. науч.-практ. конф. /ГНУ ВИЭВ. - М.: Изографъ, 2006.-С. 362-363.
4. Балышев, В.М. Анализ гематологических показателей мелких жвачных животных, привитых аттенуированным штаммом «ММ» вируса болезни Найроби /В.М. Балышев, **Е.А. Румянцева**, А.Н. Жуков// Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. науч. конф./ УГСХА. - Ульяновск, 2006.-С.132-134.
5. **Румянцева, Е.А.** Изучение сохраняемости культурального штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби /Е.А. Румянцева// Научные основы производства ветеринарных и биологических препаратов: материалы Междунар. науч.-практич. конф./ГНУ ВНИТИБП.- Щелково, 2006.- С. 111-113
6. Сравнительный анализ гематологических показателей у овец, привитых против болезни Найроби, чумы мелких жвачных животных и оспы овец /**Е.А. Румянцева**, И.П. Михалкин, Ю.А. Горькавский // Материалы первого съезда ветеринарных фармакологов России/ГНУ ВНИВИПФиТ–Воронеж,2007.-С.511-514.
7. Адаптация и иммуногенность культурального штамма ММ вируса болезни Найроби /В.М. Балышев, **Е.А. Румянцева**, А.Н. Жуков, Е.П. Прилепская, А.А. Коломыцев // Ветеринария.- 2007.- №2.- С.16-19.
8. **Румянцева, Е.А.** Изучение антигенных и иммуногенных свойств культурального штамма «ММ/К-05» вируса болезни Найроби инактивированного теотропином /Е.А. Румянцева// Ветеринарная патология.- 2007.- №4.- С.100-102.

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

Тираж 70 экз.