

ВЕТЕРИНАРИЯ

УДК 619:616.98:578.821.21:615.371:636.32/38

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАКЦИНЫ ЖИВОЙ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ОСПЫ ОВЕЦ

В.А. Бабак, И.А. Пунтус, А.А. Гусев, А.А. Згировская, Ю.В. Ломако

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии

им. С.Н. Вышелесского»,

г. Минск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. В статье представлены результаты исследования по конструированию вакцины живой лиофилизированной для специфической профилактики оспы овец. Отработаны параметры накопления вирусной биомассы в культуре клеток 3-КГ, режим высушивания и стабилизирующая среда для лиофилизации. Проведены исследования антигенной активности вируса оспы, которая составила 5,5-6,0 lgТЦД₅₀.

Summary. The results of research on designing of the live lyophilized vaccine for specific preventive maintenance of sheep pox are presented in the article. Parameters of accumulation of a pox virus in the culture of cells of 3-CG, a mode of drying and the stabilising medium for lyophilizing are developed. The researches of antigen activity of pox virus were carried out, which constituted 5,5-6,0 lgCCD₅₀.

Введение. Оспа овец (Sheep pox) – высококонтагиозная особо опасная болезнь, характеризующаяся лихорадкой и образованием в эпителии кожи и слизистых оболочек папулезно-пустулезных поражений. Болезнь широко распространена в Турции, Иране, Пакистане, Афганистане, Индии, Марокко, Алжире, Тунисе, Ливии, Кувейте и многих других странах Азии и Африки. В РФ заболевание эпизодически регистрируют на пограничных территориях. Согласно решению МЭБ, оспа овец и коз отнесена к группе А – быстро распространяющихся болезней животных. Болезнь наносит овцеводству огромный ущерб, включающий потери от гибели и вынужденного уоя больных животных, снижения продуктивности, обострением вторичных инфекций, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий. Оспа мелкого рогатого скота остается актуальным заболеванием в мире, о чем свидетельствуют случаи ее регистрации в последние годы в разных странах мира (Китай, 2002-2003; Монголия, 2006; Греция, 2007; Турция, 2001; Таджикистан, 2001; Вьетнам, 2005 и другие).

В случаях генерализованного и осложненного течения болезни гибель овец достигает 50% от количества заболевших. Вирус передается животным в основном аэрогенным путем. Виремия наступает перед генерализацией процесса. У больных животных вирус локализуется в основном в оспинах. Он не имеет антигенных вариантов. Переболевание сопровождается длительным иммунитетом (не менее двух лет) и образованием антител, которые с молозивом и молоком передаются потомству [3, 4, 5, 6, 7, 8].

В Республике Беларусь аналогов инактивированных и живых вирусвакцин для профилактики оспы овец не производится. Использование вакцин, завозимых из стран дальнего и ближнего зарубежья, экономически не оправдано из-за высокой себестоимости. Кроме того, вступление Республики в Таможенный Союз повысило риск заноса высококонтагиозных инфекций из Средней Азии, среди которых оспа овец, ящур, сибирская язва, АЧС, чума мелких жвачных животных, блютанг, бруцеллез и другие. В связи с этим в Республике Беларусь разработка и применение отечественной вакцины для профилактики оспы овец является актуальной задачей ветеринарной науки, а сама вирус-вакцина – экспортно-ориентированной.

Целью наших исследований явилась разработка технологии изготовления культуральной живой лиофилизированной вирусвакцины для иммунизации против оспы овец.

Для достижения цели в наших исследованиях были поставлены задачи:

1. из имеющихся в работе синтетических и ферментативных питательных сред подобрать оптимальную среду для выращивания культуры клеток 3-КГ и адаптировать ее с эмбриональной сыворотки к нормальной сыворотке крови КРС;
2. определить оптимальную посевную концентрацию клеток для пассажирования и выдачи к заражению в матрасах и роллерах;
3. адаптировать вирус оспы к культуре клеток 3-КГ и отработать рациональную технологическую схему накопления вируса;
4. подобрать оптимальную среду высушивания вируса.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в отделе культур клеток и питательных сред и лаборатории биотехнологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В опытах использовалась перевиваемая линия клеток 3-КГ (гонады козы), депонированная в коллекции культур клеток РУП "Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского". Культура клеток 3-КГ представляет собой фибробластоподобные полигональные

клетки с кариологической характеристикой $2n=60$. На сформированном монослое культура представляет собой веретеновидно переплетенные клетки с округлым ядром. Первично полученная культура клеток 3-КГ культивировалась на полусинтетической питательной среде ПСС и добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Для адаптации культуры клеток использовали синтетические среды МЕМ, 199, ДМЕМ и ферментативные ФГМ-С и ГЛА в различных сочетаниях компонентов. Хорошие результаты по ростовым свойствам и морфологии были получены при сочетании компонентов ФГМС + ДМЕМ 3:1 с добавлением 0,2 г/л глюкозы и 100-150 мг/л L-глутамина. Адаптацию к сыворотке крови КРС проводили в течение 4-х пассажей, заменяя ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100%.

Культивирование клеток проводилось по общепринятой методике на пластиковых матрасах ($V=50-200 \text{ см}^3$), стеклянных матрасах ($V=1500 \text{ см}^3$) и стеклянных роллерных флаконах ($V=2000-3000 \text{ см}^3$). Для определения количества клеток, индекса пролиферации и процента жизнеспособных клеток ежедневно снимали по три матраса в течение 7 дней жизненного цикла и проводили подсчет клеток в камере Горяева, используя 0,5%-й водный раствор трипанового синего по общепринятым методикам [1, 2]. Каждые 12 ч в течение 7 суток проводили микроскопирование исследуемой линии клеток, оценивая состояние культуры, морфологию, формирование клеточного монослоя.

В исследованиях использовали вакцинный вирус оспы штамм «НИСХИ», полученный из ФГУ «ВНИИЗЖ» и депонированный в коллекцию микроорганизмов нашего института как штамм вируса оспы «НИСХИ» «КМИЭВ-V140».

Адаптацию вируса оспы штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» проводили в течение 4-х слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:20, при этом инфекционную активность вируса определяли только на последнем пассаже. Титрацию вируса оспы проводили на культуре клеток пробирочным способом и в 96-ти луночных микропланшетах. Расчет титра вируса производили по методу Кербера и выражали в $\text{lgTCID}_{50}/\text{мл}$.

Отработку накопления биомассы вируса оспы проводили на сформированный монослой с контактом и сменой питательной среды на поддерживающую. Ежедневно проводили микроскопию контрольного интактного и инфицированного клеточного монослоя, оценивая степень его поражения и сравнивая ее с контролем. При отработке заражающей дозы вируса испытывали концентрации 0,01, 0,1, 0,5 и 1,0 $\text{TCID}_{50}/\text{кл}$.

Накопленная по оптимальной схеме биомасса вируса оспы использовалась при подборе защитной питательной среды для лиофильного высушивания вируса оспы. С этой целью использовали следующие компоненты: сыворотку крови КРС и ЭТС, пептон, желатозу, сахарозу, ГЛА, которые смешивали в различных комбинациях и процентных соотношениях. После высушивания определяли на какой защитной среде сохранность вирусной активности была выше.

Результаты исследований и обсуждение. Для эффективного роста культур клеток различного происхождения проводился тщательный подбор синтетических и ферментативных питательных сред, различающихся аминокислотным, витаминным и солевым составом для конкретной производственной линии клеток в условиях определенных схем и методов культивирования.

Культивирование перевиваемой линии клеток 3-КГ (гонады козы) проводили с использованием синтетических и ферментативных питательных сред. Базовым вариантом являлись среды ПСС и DMEM. В опытах по подбору и модификации среды использовали ферментативные и синтетические питательные среды: 0,25% гидролизат мышечных белков (ФГМ-С), среда 199, EMEM. Во всех вариациях питательных сред присутствовала эмбриональная сыворотка крови КРС (10%), антибиотики – бензилпенициллин и стрептомицина сульфат в дозе 100 ЕД/мл и корректирующий рН 7,57% раствор бикарбоната натрия.

В качестве компонентов обогащения модифицированных питательных сред использовали добавления глюкозы (до 2000 мг/л) и глутамина (100-150 мг/л). Глюкоза является легкодоступным энергетическим материалом для перевиваемых культур клеток. Глутамин, как незаменимая аминокислота, содержится в ферментативных средах в недостаточных количествах и требует обязательной корректировки в питательной среде, используемой для выращивания клеток, так как является лимитирующим фактором, который сказывается на ростовых свойствах клеток в длительных пассажах.

Результаты исследований роста перевиваемой линии клеток 3-КГ представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Данные исследования ростовых свойств клеток 3-КГ при культивировании стационарным способом

Компоненты среды	Проведено пассажей	Выход клеток с матрикса, ср. знач., млн.кл.	Индекс пролиферации
1	2	3	4
ПСС *	8	41,8±4,94	4,2
DMEM	6	31,67±6,63	3,2
199	6	25,27±5,48	2,5
EMEM	4	33,33±4,08	3,3

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
ФГМС-С	6	28,33±5,35	2,8
ФГМС-С+ДМЕМ	10	39,0±5,2	3,9
ДМЕМ+ЕМЕМ	8	30,0±7,05	3,0

* – базовый вариант культивирования

P < 0,05

Как видно из таблицы 1, хорошие результаты получены на среде ФГМС+ДМЕМ 3:1, которые сопоставимы с базовой средой ПСС и выше, чем на других обрабатываемых питательных средах, в 1,4-1,6 раза.

На следующем этапе мы провели замещение эмбриональной сыворотки крови телят на нормальную сыворотку крови КРС, заменяя в течение 4-х пассажей ЭТС пошагово на 30, 50, 70 и 100% нормальной сыворотки на 4-м пассаже соответственно. В ходе проведенных работ культура клеток несколько изменила морфологию, стала более вытянутой, веретеновидной, а ИП снизился с 3,9 до 3,5. Оптимальная посевная концентрация составила 70-110 тыс.кл/мл для проведения 5-7 суточных пассажей.

В дальнейшем подбиралась посевная концентрация клеток 3-КГ для получения полного монослоя на 48 и 72 часа, которая составила 170 и 130 тыс. кл/мл ±15% соответственно. С посеянных матрасов на 2-е и 3-е сутки снимали монослой для определения концентрации выросших клеток, что будет учтено при расчете дозы заражения вирусом. Так, при 2-суточном цикле культивирования (170 тыс. кл/мл) на вторые сутки в монослое было 30-35 млн. кл./матр, а на третьи сутки (130 тыс. кл/мл) – 34-39 млн.кл./матр.

При культивировании клеток 3-КГ роллерным способом обрабатывали посевную концентрацию клеток 30-35 млн.кл./рол. для проведения пассажей и 50-55 млн.кл./рол. для выдачи на 48 ч на заражение.

Адаптацию вируса оспы овец штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» проводили в течении 4-х слепых пассажей на полный монослой клеток в объемной дозе 1:20, при этом от пассажира к пассажиру проявление цитопатического действия усиливалось и выражалось в округлении клеток, дегенерации клеточного монослоя, формировании специфических «гроздей». К четвертому пассажиру ЦПД проявлялось с 48-72 ч, а полное поражение монослоя к 96-120 часам.

Для отработки эффективного накопления вакцинного вируса оспы полученный 4-й пассаж был протитрован на культуре клеток 3-КГ и использован в дальнейшем для отработки технологической схемы накопления вируса оспы, которая включала определение множественности заражения, сроков инкубации инфицированных клеток и активности получаемого вируса оспы (ВО).

Для проведения серии экспериментов нами были сформированы 4 группы матрасов, содержащие линию клеток 3-КГ с монослоем клеток на 85-100% поверхности. В первой группе матрасов вирус оспы вносили в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл. Во второй группе множественность заражения составила 0,1 ТЦД₅₀/кл, в третьей – 0,5 ТЦД₅₀/кл, в четвертой – 1,0 ТЦД₅₀/кл. При поражении 85-100% клеточного монослоя отбирали пробы вирусосодержащего материала согласно схеме опытов для определения инфекционной активности вируса. В качестве контроля использовали интактную линию клеток 3-КГ (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика накопления вируса оспы штамм «НИСХИ» «КМИЭВ-V140» в линии клеток 3-КГ при стационарном культивировании

№ группы	Множественность заражения, ТЦД ₅₀ /кл	Количество клеток, млн.кл/матр	Срок культивирования вируса с клетками, часы				
			24	48	72	96	120
			титр вируса, lg MLD ₅₀ /мл, (±0,25 lg)				
1-я	0,01	35,0±3,6	-	-	4,0	5,0	5,25
2-я	0,1	35,0±3,6	-	4,25	5,5	6,0	-
3-я	0,5	35,0±3,6	-	5,0	5,75	5,5	-
4-я	1,0	35,0±3,6	-	4,75	4,5	4,0	-
Контроль	интактная	35,0±3,6	-	-	-	-	-

Из таблицы 2 видно, что максимальное накопление вируса отмечалось к 72 часам культивирования при дозе 0,5 ТЦД₅₀/кл и к 96 часам при 0,1 ТЦД₅₀/кл, при этом титр инфекционной активности составил 5,5-6,0 lgТЦД₅₀. При более низкой дозе вируса (0,01 ТЦД₅₀/кл) ЦПД начиналось на более поздние сроки и достигало 85-100% к 96-120 ч от начала инкубирования. При множественности 1,0 ТЦД₅₀/кл максимальный титр составил 4,75 lgТЦД₅₀ к 48 часам и снижался при дальнейшем культивировании. Наиболее рациональной и экономически обоснованной была принята множественность заражения 0,1-0,5 ТЦД₅₀/кл и культивировании 72-96 часов с поражением 85-100% клеточного монослоя.

По отработанной лабораторной схеме стационарно в 1,5-литровых матрасах РУ была накоплена биомасса вируса оспы. Культивирование вируса проводили в течение 72-96 часов. По истечении указанного времени содержимое флаконов с выраженным ЦПД вируса на монослое клеток замораживали, размораживали и объединяли, затем определяли стерильность и титр вируса в культуральной жидкости и хранили при минус 40⁰С. Использовали полученный материал при подборе оптимальной защитной питательной среды для лиофильного высушивания вируса оспы. С этой целью использовали компоненты: сыворотку крови КРС и ЭТС, пептон, желатозу, сахарозу, ГЛА.

Лиофилизацию вирусной суспензии проводили на установке для лиофильного высушивания с программным обеспечением фирмы “Krist” (Германия) в течение 72 часов.

При подборе стабилизирующей защитной среды испытывали два варианта. Одна среда состояла из сахарозы, пептона и желатозы, вторая – из гидролизата лактальбумина, сахарозы и желатозы. Качество защитной среды определяли по сохранению инфекционной активности вируса до лиофилизации и после. Инфекционную активность вируса оспы овец определяли титрованием на культуре клеток 3-КГ.

Для создания экспериментального образца вакцины против оспы овец использовали вирусосодержащую жидкость с титром $5,8 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вирусосодержащую культуральную жидкость размораживали, соединяли с защитной средой в процентном соотношении 60:40 и подвергали лиофилизации в течение 48 часов.

Результаты влияния защитной среды на сохранение вируса при лиофилизации представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние защитной среды на сохранение инфекционной активности вируса оспы овец при лиофилизации

Защитная среда	Титр вируса, $\text{lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$		Достоверность, Р
	до лиофилизации	после лиофилизации	
Сахароза Пептон Желатоза	5,8	5,3	<0,05
ГЛА Сахароза Желатоза	5,8	5,5	<0,05

Как видно из таблицы 3, лучшие результаты по сохранности вируса оспы и формированию вакцинной таблетки были получены с использованием компонентов ГЛА+желатоза+сахароза+сыворотка крови КРС в соотношении 60% вирусосодержащей жидкости и 40% защитной среды. Титр активности вируса при высушивании снижался на 0,2-0,5 lg TЦД_{50} . В ходе проведенных исследований было установлено, что при одинаковых компонентах защитной среды высушивания нормальная сыворотка крови КРС выполняет консервирующую функцию не хуже эмбриональной сыворотки и является более дешевым компонентом.

Заключение. Таким образом, нами была сконструирована живая лиофилизированная вакцина против оспы овец: подобрана оптимальная клеточная модель и питательная среда для выращивания культуры клеток 3-КГ, отработана технологическая схема и параметры накопления вирусной биомассы, а также защитная стабилизирующая питательная среда и условия высушивания вируса оспы.

Дальнейшие испытания вакцины будут направлены на изучение физико-химических и биологических показателей: определение внешнего вида, остаточной влажности, растворимости, наличие вакуума, контаминации бактериальной и грибковой микрофлорой, на определение безвредности препарата в пяти- и десятикратной иммунизирующей дозах на 3-4-месячных овцах и иммуногенной активности биологического препарата на овцах с последующим исследованием сыворотки крови в реакции нейтрализации на наличие вируснейтрализующих антител на культуре клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс, Р. Методы культуры клеток для биохимиков / Р. Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с.
2. Аттестации перевиваемых клеточных линий – субстратов производства и контроля медицинских и иммунобиологических препаратов : методические указания. – М., 1989. – 33 с.
3. Дмитриев, А.Ф. Особенности эпизоотического процесса оспы овец в Ставропольском крае / А.Ф. Дмитриев, В.И. Дорофеев, В.И. Дегтярев // Вестник ветеринарии. 1999. – С. 68-70.
4. Нургазиев, Р.З. О распространенности оспы овец и мерах борьбы с ней в некоторых странах мира / Р.З. Нургазиев, Г.К. Акматова, Э.Д. Иманов // Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней жив-х: сб. матер, конф. Самарканд, 2004. – С. 131-133.
5. Особо опасные болезни животных И.А. Бакулов, В.М. Котляров, Т.А. Власова [и др.]. - Покров: ВНИИВВиМ, 2002. – С. 97-106.
6. Хухоров, И.Ю. Оспа овец в странах СНГ / И.Ю. Хухоров // Биологоэколог, проблемы заразных болезней диких жив-х и их роль в патологии сХ. жив-х и людей: матер. Междунар. науч.-практ. конф. Покров, 2002. – С. 206-211.
7. Эпизоотология оспы овец / Э.Д. Иманов, Н. Нурмарбетов, К.Р. Рыскулов [и др.] // Актуал. пробл. с.-х. биотехнологии: матер, конф. - Гвардейский, 1998. - 128 с.
8. Epidemiology of sheep pox L.M. Belwal, A.E. Nivsarkar, P.B. Mathur, R.M. Singh Trop. Anim. Hlth. Prod. 1982. №14. - P. 229-233.

УДК 619:616.1/4 (075.8)

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО, ВИТАМИННОГО ОБМЕНОВ В КРОВИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЕ У ГЛУБОКОСТЕЛЬНЫХ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ КОРОВ С СИМПТОМАМИ ОЖИРЕНИЯ

Ю.Н. Бобёр

УО «Гродненский государственный аграрный университет»,
г. Гродно, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 24.06.2013 г.)

Аннотация. Изучены показатели липидного, витаминного обмена и морфологические изменения в щитовидной железе у глубоководных высоко-