

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют, что по маркерному признаку *d* (свойство образовывать мелкие бляшки), а также времени появления бляшек есть отличия как среди клонов штаммов разных серотипов, так и между штаммами одного и того же серотипа.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют, что между клонами бляшек штаммов энтеровирусов свиней, как коллекционных, так и эпизоотических (тех же серотипов) есть отличия (нп.: маркер *d*), которые требуют детального изучения, для чего будет проведено дальнейшее исследование клонов этих штаммов по другим маркерным признакам.

Литература. 1. Поширення ентеровірусів свиней в умовах зони Полісся УРСР/ В. П. Романенко, В. Н. Опанасенко// Мікробіологічний журнал, 1972, №1, С. 121- 122. 2. Керованість інфекційним процесом при ентеровірусних хворобах свиней/ В. П. Романенко, В. Б. Білоштан, І. Ф. Соколянський, Л. М. Музикіна та ін.// Вет. Біотехнологія. – 2007. – № 10. – С. 188–195. 3. Wallis C., Melnick J. L. Virology, 1962, 16, 504. 4. Ворошилова М. К. Иммунология, эпидемиология и профилактика полиомиелита и сходных с ним заболеваний. – М.: Медицина, 1966. – 439 с. 5. Ворошилова М. К. Энтеровирусные инфекции человека. – М.: Медицина, 1979. – 360 с. 6. Гендон Ю. З. Генетика вирусов человека и животных. – М.: Наука, 1967. – 356 с. 7. Бляшкообразующие свойства энтеровирусов свиней// В. Ф. Романенко, О. Г. Прусс. Тезисы докладов Всесоюзной межвузовской научной конференции по вет. вирусологии.- М, 1973, ч. I, ст. 47-38.

УДК 619:616.98:578.824.11

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВИРУСА БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Ероховец Н.Ф.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск

Статья посвящена подбору оптимальных параметров культивирования вируса болезни Ауески свиней для максимального его накопления при промышленном производстве вакцины. Установлено, что наиболее подходящей культурой клеток для накопления вируса является ВНК-21, максимальный титр вируса при стационарном способе культивирования составлял $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при множественности инфицирования - $0,01 - 0,1 \text{ТЦД}_{50}$, а при роллерном - $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Article is devoted to selection of optimum parameters of cultivation a virus of Aujeszky's disease for its maximum accumulation to vaccine industrial production. It is established that the most suitable cell culture for virus accumulation is ВНК-21, maximum virus title in stationary way cultivation is $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ in plurality infection - $0,01 - 0,1 \text{ТЦД}_{50}$, and in "spinner-culture" method - $8,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$

Введение. Массовое выращивание клеток в культуре является центральным звеном любого технологического процесса, основанного на использовании клеток животных, и в первую очередь производства противовирусных препаратов. Эта стадия определяет массу и количество клеток и тем самым в целом технологию получения вирусного сырья. Выбор способа культивирования вируса в значительной мере определяется способностью клеток размножаться на поверхности плотного субстрата или в суспензионной культуре.[3, 4, 5, 6]

При получении вакцин вирус выращивают в однослойных и суспензионных культурах различного происхождения. Суспензионные культуры постоянных линий клеток оказались весьма продуктивными для промышленного получения вирусного сырья. Вирус в этих системах накапливается в титре $10^8 - 10^9 \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ [1, 2].

Определяющим параметром для изготовления любого вакцинного препарата является способность вируса размножаться в чувствительной биологической модели с накоплением в максимальном титре. В связи с чем целью нашего исследования являлось отработка способа накопления вируса в перевиваемой культуре клеток с максимальным титром, определение множественности инфицирования ткани вируса [1, 2]

Материалы и методы. Для создания вакцины был использован выделенный нами штамм вируса. Выделение вируса проводили на перевиваемой клеточной линии ВНК-21. Культивирование проводили стационарным методом в 1,5 литровых матрацах. Вирус болезни Ауески инокулировали после удаления ростовой среды и трехкратного промывания монослоя раствором Хенкса. Контакт вируса с клетками осуществляли в течение 1 часа. Затем вносили по 150 см^3 поддерживающей питательной среды. Инкубирование инфицированных культур клеток проводили при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Контролем служили матрасы с незараженными клетками. Учет результатов проводили, начиная с 17-го часа после заражения культуры клеток. При наличии цитопатического действия вируса для освобождения его из клеток матрасы замораживали при температуре минус 40°C и оттаивали при плюс 25°C . Исследованию подлежал вирусный материал после однократного замораживания-оттаивания вирусной суспензии, снятой через 1-2 суток после инокуляции вируса в культуру клеток.

После накопления вируса определяли его инфекционную активность титрацией на культуре клеток по стандартной методике.

Готовили десятикратные разведения вирусной суспензии на среде Игла MEM. Для получения разведения 10^{-1} , в стерильный флакон, содержащий $9,0 \text{ см}^3$ питательной среды вносили $1,0 \text{ см}^3$ пробы, тщательно перемешивали пипетированием. Затем 1 см^3 этого разведения вносили во второй флакон с 9 см^3 среды, тщательно перемешивали, затем из второго флакона брали 1 см^3 раствора и вносили в третий, содержащий 9 см^3 среды, и так далее, до восьмого флакона, получая последовательно разведения: $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$.

Культуру клеток ВНК-21 заражали каждым разведением вирусной суспензии (по четыре пробирки с культурой клеток для каждого разведения). Для этого, в каждую пробирку с монослоем культуры клеток ВНК-21 с помощью пипетки стерильно вносили по $0,2 \text{ см}^3$ каждого разведения ($10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$)

вируса. Затем пробирки помещали в термостат, обеспечивающий температуру нагрева плюс $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, и выдерживали в течение часа, затем добавляли по 0,8 среды и оставляли культивировать в течение пяти суток. Титр инфекционности вакцины ($\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) определяют по методу Рида и Менча.

В дальнейшем мы определяли чувствительность выделенного вируса к различным клеточным линиям ВНК -21, РК-15, СПЭВ и МДВК. Заражение этих клеточных линий проводили по стандартной методике, описанной выше.

Результаты и их обсуждение. Для определения наиболее оптимальной перевиваемой культуры клеток для накопления вируса в максимальной титре использовали линии: ВНК-21, СПЭВ, РК-15, МДВК. Вирус разводили питательной средой и вносили в матрас из расчета 0,1, 0,01 и 0,001 ТЦД_{50} на клетку. На указанных клеточных линиях выделенный штамм накапливался через 1-2 суток после заражения в стационарных условиях в титрах 4,2-7,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. На всех культурах клеток было проведено по 7 пассажей вируса. Результаты накопления вируса болезни Ауески представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Накопление вируса болезни Ауески в перевиваемых культурах клеток ВНК-21, СПЭВ, РК-15, МДВК

Клеточные культуры	ЦПД	Накопление штамма ($\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$)
ВНК-21	+	6,0-7,5
РК-15	+	6,0
СПЭВ	+	4,2-5,66
МДВК	+	5,2

Как видно из таблицы 1 наиболее чувствительными оказались ВНК-21 и РК-15, титр вируса достигал 6,0-7,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и 6,0 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. В дальнейшем накопление вируса проводили на культуре клеток ВНК-21, так как ВНК-21 можно культивировать на роллерах, что дает больший выход вируса (объем роллера составляет от 2 до 4 л).

Следующий этап работы заключался в определении множественности инфицирования выбранной культуры клеток вирусом. Для этого клеточный монослой заражали различными дозами вируса – от 0,001 до 0,1 ТЦД_{50} . Время инкубации составляло 24-48 часов. Результаты накопления вируса представлены в таблице 2

Таблица 2 – Определение множественности инфицирования культуры клеток ВНК-21

Клеточные культуры	Доза для заражения, ТЦД_{50} на клетку	Время накопления вируса, час.	Накопление вируса, $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
ВНК-21	0,2	24	7,5
ВНК-21	0,1	24	7,5
ВНК-21	0,01	24	7,0
ВНК-21	0,001	48	6,0

Как видно из таблицы 2 наиболее оптимальными дозами заражения ВНК-21 являются 0,01 – 0,1 ТЦД_{50} , так как титр вируса составил 7,0-7,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ соответственно. Увеличение дозы заражения до 0,2 ТЦД_{50} не приводило к увеличению титра.

Известно, что перевиваемая культура клеток ВНК-21 хорошо культивируется на роллерах, поэтому следующий этап работы заключался в изучении возможности культивирования вируса болезни Ауески роллерным способом. Для этого провели 7 пассажей вируса на роллерах с начальным титром 3,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Как видно из таблицы 3 при роллерном способе культивирования вируса болезни Ауески титр составлял 7,25-8,0 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, в то время как при стационарном культивировании он был ниже и составил 6,0-7,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Следует заметить, что с увеличением количества пассажей до 7 титр вируса начинает снижаться.

Таблица 3 – Результаты сравнительного культивирования штамма вируса болезни Ауески свиней роллерным и стационарным способом в перевиваемой линии клеток ВНК-21

Пассаж	ЦПД	Титр вируса при культивировании при	
		стационарном способе, $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	роллерном способе, $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
1	+	3,5	3,5
2	+	4,0	4,55
3	+	4,66	5,5
4	+	5,3	6,25
5	+	6,0	7,0
6	+	7,5	8,0
7	+	7,5	7,25

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований отработаны параметры культивирования вируса болезни Ауески, которые заключались в следующем:

- подобрана наиболее подходящая культура клеток для накопления вируса, которой является ВНК-21
- максимальный титр вируса при культивировании в культуре клеток ВНК-21 стационарным способом составлял 7,5 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$
- определена множественность инфицирования культуры клеток – 0,01 – 0,1 ТЦД_{50}
- определено, что роллерное культивирование вируса является наиболее оптимальным, так как увеличиваются титр вируса до 8,0 $\text{lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и объем получаемого вируса.

Литература. 1. Абдрахманов, С.К. Биологические свойства эпизоотического штамма «КОРДАЙ» вируса болезни Ауески / С.К. Абдрахманов, С.М. Мамадалиев // Журн. Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2007. – № 5 – С. 55-57. 2. Жестерев, В.И. Оценка некоторых биологических свойств штаммов вируса болезни Ауески / В.И. Жестерев [и др.] // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы науч.-практ. конф. ВНИИВВиМ – Покров, 1995. – С. 147-148. 3. Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П) [Электронный ресурс]. – Электрон., текстовые дан. и прогр. (2,33 Мб). – М., 2007. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). 4. Рубан, Е.А. Оптимизация и масштабирование процессов глубокого культивирования микроорганизмов и клеток животных / Е.А. Рубан // Тезисы науч.-производ. конф. «100 лет Курской биофабрике и агробиологической промышленности». – Россия : Курск, 1996. – С. 42–57. 5. Самуйленко, С.А. Потребность в кислороде и его снабжение культуры клеток / С.А. Самуйленко, Е.А. Рубан, А.Я. Самуйленко // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов : материалы Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2003. – Ч. 2. – С. 562–566. 6. Сергеев, В.А. Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии / В.А. Сергеев, Ю.А. Собоко. – К.: Урожай, 1990. – 152 с.

УДК 619:616.98:578.824.11

АНАЛИЗ ЭПИЗОТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНИ АУЕСКИ СВИНЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ**Ероховец Н.Ф.**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского», г. Минск

Статья посвящена анализу эпизоотической ситуации по болезни Ауески свиней в Республике Беларусь. Проведен выборочный мониторинг свинокомплексов четырех областей, являющихся благополучными по болезни Ауески свиней и вакцинация против этого заболевания не проводится. Установлено, что из 16 обследованных хозяйств в 6 заболевание протекает в латентной форме.

Article is devoted to analysis epizootic situation on Aujeszky's Disease of pigs in Byelorussia. Selective monitoring of a swine farms from four areas which are safe from Aujeszky's Disease of pigs is carried out and immunization against this disease isn't used. It is established that from 16 of survey farms in 6 disease proceeds in the latent form.

Введение. В настоящее время болезнь Ауески наносит значительный ущерб странам с развитым свиноводством. По данным МЭБ [1] за период с 1967 по 2010гг. это заболевание регистрировали в 75 странах Европы, Азии, Латинской Америки. Она встречается на всех континентах, кроме Австралии. В течение этого периода постоянно продолжается процесс оздоровления стран и возникновения инфекции в новых странах. Тем не менее, отмечена тенденция к уменьшению напряженности эпизоотической ситуации в мире [2, 4, 5].

Аналогичная ситуация наблюдается и в нашей республике, однако оценить реальную эпизоотию болезни Ауески свиней на территории нашей страны практически невозможно. Причин этого несколько: это и широкомасштабное проведение иммунизаций немаркированными вакцинами, и отсутствие проведения целенаправленного мониторинга в свиноводческих хозяйствах и в дикой фауне, и применение в ветеринарных лабораториях ограниченного числа методов диагностирования.

На протяжении последних лет регистрируют ежегодно по одному неблагополучному пункту по болезни Ауески свиней, что связано в первую очередь, с отсутствием ярко выраженных характерных клинических признаков у свиней. Все чаще наблюдают хроническое и латентное течение болезни, что характерно для этого вируса [3, 6]

Если провести анализ статистических данных развития эпизоотической ситуации по болезни Ауески (Таблица 2), то явно просматривается, что пик стадии подъема эпизоотии приходится на период 1950-1955 годы, и затем идет плавная стадия угасания эпизоотического процесса. И в последующие периоды вплоть до настоящего момента не наблюдалось устойчивого подъема эпизоотического процесса при относительном равновесии в обозначенных пятилетних периодах, что свидетельствовало об эффективности принимаемых противоэпизоотических мероприятий.

Таблица 1 – **Некоторые показатели эпизоотической ситуации болезни Ауески свиней в Республике Беларусь**

Периоды времени, годы	Ежегодно выявлялось неблагополучных пунктов (М)	Ежегодно выявлялось клинически больных свиней (М)	Вакцинировано, тысяч особей
1950 -1955	308±80	2534	-
1955 -1960	148±30	1866	-
1960 -1965	78±30	2439	302,0
1965 -1970	52±15	1881	234,0
1970 -1975	39±22	2286	1344,9
1975 -1980	11±4	119	2410,1
1980 -1985	6±1	170	2568,8
1985 -1990	3 ±1	161	2477,0
1990 - 1995	4±1	132	941,8
1995 - 2000	3	-	865,1
2000 - 2005	3	-	1785,0
2005 - 2010	1	-	790,0

Основными мерами борьбы с указанной эпизоотией в 1950 -1960 годы были общие ветеринарно – санитарные, направленные на выявление больных животных, их изоляцию и убой с последующей дезинфекцией животноводческих помещений. Статистические данные показывают на значительное уменьшение ареала