

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

**КЫРГЫЗСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени К.И. СКРЯБИНА**

**Диссертационный совет Д.06.11.037**

*На правах рукописи*  
УДК 619.578.835.1

**НУРГАЗИЕВА АСЕЛ РЫСБЕКОВНА**

**«БИОТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЯЩУРА ТИПА А ИЗ ШТАММА "ЧУЙ  
2002"»**

06.02.02 - ветеринарная микробиология,  
вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

## **БИШКЕК – 2012**

**Диссертационная работа выполнена в лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии им. А. Дуйшеева, на базе закрытого акционерного общества «Алтын-Тамыр» и неблагополучных по ящуру хозяйств республики.**

**Научный руководитель:** доктор биологических наук

**Джапаралиев Нурлан Тынчтыкбекович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор

**Доолоткельдиева Тинатин Доолоткельдиевна**

кандидат ветеринарных наук

**Буларкиев Кубанычбек Усубалиевич**

**Ведущая организация:** Казахский Национальный Аграрный Университет, г Алматы, Республика Казахстан.

Защита диссертации состоится “11” мая 2012 г. в 9.30 часов на заседании диссертационного совета Д.06.11.037 при Кыргызском национальном аграрном университете им. К.И.Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О.Медерова, 68

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета им.К.И.Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. Медерова, 68.

Автореферат разослан “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат ветеринарных наук

Крутская Е.Д.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность.* Ящур во всем мире является одной из социально значимых болезней животных, приносящий огромный убыток владельцам сельскохозяйственных животных. Наряду с непосредственным убытком, в виде потерь продукции животноводства и гибели животных, ущерб складывается из введения торговых ограничений, на экспорт продуктов животного происхождения.

По отчетным данным Департамента государственной ветеринарии, Министерства сельского хозяйства и мелиорации Кыргызской Республики о заболеваемости животных, наиболее уязвимый к ящуру крупный рогатый скот.

Ящур, как острозаразное заболевание, занесен в список МЭБ. И для республики являющимся членом ВТО важным требованием является благополучие по ящуру для участия в международной торговле животными и продукцией животноводства.

Одним из наиболее эффективных методов профилактики ящура является систематическая иммунизация сельскохозяйственных животных инактивированными моно - и поливалентными вакцинами. Непременным условием противоэпизоотической эффективности противоящурных вакцин является соответствие антигенных свойств производственного (вакцинного) штамма вируса ящура эпизоотическим штаммам вируса. Оно определяется путем сравнительного изучения антигенных свойств штаммов вируса ящура.

При выборе вакцины, предназначенной для массовой иммунизации, особое внимание обращают на безопасность применения и длительность иммунитета у животных после применения вакцины.

Для получения безопасных инактивированных вакцин применяют различные инактиванты и подбирают оптимальные условия инактивации. В таких условиях вирус должен полностью утрачивать свои инфекционные свойства и максимально сохранять антигенность.

С технологической точки зрения при промышленном производстве противоящурных вакцин наибольший интерес представляет эффективность выращивания клеток и максимальный выход вируса.

Максимальное накопление вируса ящура обеспечивается при культивировании в суспензионной культуре клеток ВНК-21.

Для получения качественных противоящурных вакцин необходимо подбирать штамм вируса, обладающий высокой иммуногенной активностью. Отработать метод очистки и концентрирования вируса,

использовать инактивант, обеспечивающий устранение инфекционности с сохранением иммуногенности, а также подбирать адъюванты, усиливающие иммуногенный ответ организма животных на введение вакцины (Mason P W., 2003).

**Связь темы диссертации.** Научно-исследовательская работа по данной проблеме выполнялась в соответствии с тематическим планом лаборатории вирусологии и биотехнологии Кыргызского научно-исследовательского института ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева по теме: «Эпизоотологический, серологический мониторинг ящура сельскохозяйственных животных и разработка средств специфической профилактики на основе местных штаммов» № государственной регистрации 0004028.

**Цель исследования.** Целью работы было усовершенствование технологии производства вакцины против ящура из вируса, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21.

**Задачи исследования:**

- усовершенствовать метод промышленного культивирования вируса ящура в суспензионной культуре клеток ВНК-21;
- разработать способ подготовки посевного вируса;
- разработать режим инактивации вируса ящура в больших объемах с помощью димерэтиленимина;
- оптимизировать условия концентрирования культурального вируса ящура;
- изучить сохранность иммуногенных свойств противоящурной вакцины при различных температурах хранения;
- проверить иммунобиологические свойства инактивированной культуральной противоящурной вакцины, изготовленной из вируса, выращенного в суспензионной культуре клеток ВНК-21 в лабораторных условиях.

**Научная новизна.** Усовершенствован метод культивирования вируса в суспензии культур клеток ВНК-21 в промышленных условиях.

Разработан способ подготовки посевного вирусного материала и отработан режим инактивации вируса ящура в больших объемах с применением димерэтиленимина.

Оптимизированы условия очистки и концентрирования культурального вируса ящура в больших объемах.

Установлено, что при различных температурах хранения культуральной противоящурной вакцины индекс иммуногенности при ультрафильтрации составляет 5,17 JJ и при адсорбции на ГОА 3,43 JJ.

Проверены иммуногенные свойства инактивированной культуральной противоящурной вакцины, изготовленной из вируса, выращенного в суспензии клеток ВНК-21 в лабораторных условиях.

***Практическая ценность результатов исследований.***

Изготовлена опытная серия противоящурной вакцины типа А из местного штамма «Чуй 2002» которая соответствует по иммунобиологическим параметрам предъявляемым к специфическим параметрам данного класса. Отработан штамм вируса ящура «Чуй 2002» для изготовления профилактических средств (вакцин, сывороток, диагностических тест систем). Выпущена и распространена среди фермеров рекомендация по мерам борьбы при ящуре сельскохозяйственных животных.

***Экономическая значимость разработанных результатов.***

Внедрение в ветеринарную практику инактивированной вакцины из местных штаммов для профилактики ящура типа А значительно сократит заболеваемость и падеж овец. При этом снизится расход средств на проведение организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и лечебно-профилактических мероприятий.

***Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:***

- усовершенствование метода культивирования вируса ящура в суспензии клеток ВНК-21;
- способ подготовки посевного вируса для культивирования в суспензии клеток ВНК-21;
- разработка режима инактивации вируса димерэтиленмином;
- оптимизация условий очистки и концентрирования культурального вируса ящура;
- сохранность биологических свойств антигена и вакцины против ящура в процессе хранения;
- изучение иммуногенной активности противоящурных вакцин из культурального вируса ящура.

***Личный вклад соискателя.*** Соискателем самостоятельно проведен сбор первичного материала по ящуре в Кыргызской Республике. Определена типовая принадлежность возбудителя вируса ящура. Изучены иммунобиологические свойства вакцины. Самостоятельно проведен анализ и обобщение экспериментальных данных. Научный анализ полученных данных выполнен непосредственно соискателем. Лабораторные исследования выполнены с участием сотрудников лаборатории вирусологии и биотехнологии КыргызНИИВ д.в.н., профессор член – корреспондент Р.З. Нургазиева, Е.Д. Крутской, Н.К. Абдыкеримова, Э.К. Акматаевой, Ж.Ч. Орозова, А.Т. Мамытовой, И.У. Сааданова, под научным руководством д.в.н. Н.Т. Джапаралиева.

**Апробация материалов работы.** Материалы диссертации были доложены на научных конференциях посвященной 60 летию д.в.н., профессора Арбаева Кубана Султановича, КАУ, Бишкек, 2009 г. и на заседаниях Ученого Совета КНИИВ в 2009 и 2011 годах.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, одна рекомендация по мерам борьбы с ящуром сельскохозяйственных животных.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 125 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические предложения и список литературы, который включает 163 источников, в том числе 62 из дальнего зарубежья. Работа иллюстрирована таблицами и дополнена приложениями.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность темы исследований, приводится общая характеристика биологии вируса ящура, меры специфической профилактики, культивирования вирусов, разработки вакцинных препаратов и биотехнологии их изготовления.

**В главе 1 «Обзор литературы»** по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается общая характеристика ящура, включающая историю открытия вируса, распространения заболеваний. Виды вакцинных препаратов для профилактики болезни и биотехнологические процессы их изготовления, включая технологические этапы инактивации и концентрирования, а также контроля качества.

**В главе 2 «Материалы и методы исследований»** дана характеристика объектов исследований и методический подход к выполнению исследований.

Для выделения вируса ящура были использованы патологический материал, лабораторные животные, антигены и сыворотки.

Для изготовления противоящурных вакцин использовали вирус ящура штамм "Чуй-2002", адаптированный к суспензионной культуре клеток ВНК-21, с титром инфекционности - 6,0-6,5 lg ЛД<sub>50</sub>/мл.

При изготовлении вакцины и подготовке посевного вируса использовали суспензионную и монослойную культуру клеток ВНК-21 в ростовой среде Игла и 199. В работе использовали реактивы различных фирм производства.

**Иммуноферментный анализ** проводили для выявления антигена (определения типа) и антител вируса ящура с помощью набора ИФА (ФГУ ВНИИЗЖ, г. Владимир, Россия). Данный институт является референтной лабораторией МЭБ для стран СНГ, Закавказья и Прибалтики. Реакцию ставили согласно инструкции по применению набора.

Исследование РНК вируса ящура проводили с помощью ПЦР реагентов компании «Invitrogen».

**Культивирование клеток.** Клетки ВНК-21 выращивали на среде Игла или 199 с 5% сыворотки в реакторах объемом 40-2000 литров в течение 14 дней при 37°C.

**Определение титра инфекционности вируса.** Титр инфекционности вируса определяли на культурах клеток ПЯ, ПК, ВНК-21. Для этого готовили 10-кратные разведения суспензии вирусной культуры на ФБР ( $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ) и каждым разведением заражали 4 матраса с культурой клеток. За культурой клеток вели ежедневное наблюдение в течение 14 дней. Титр инфекционности рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина.

**Проверка авирулентности антигена.** Инактивированные антигены проверяли на авирулентность на культуре клеток и с помощью ИФА.

Антиген считали авирулентным, если в течение 14 суток наблюдения в культурах клеток не было ЦПД или отрицательный результат в ИФА.

**Расчет защитной концентрации инактиванта.** Расчет 50% защитной концентрации инактивантов ( $K_{50}$ ) проводили по методике, разработанной Н.А. Улуповым.

**Методика определения вирулентной активности химических веществ.** Методика основана на определении концентрации инактиванта, которая обеспечивает снижение инфекционности вирусосодержащего препарата до  $1LD_{50}$  или  $1TCID_{50}$  в течение заданного времени, температуры и величины pH.

**Определение стерильности вирусосодержащих суспензий, антигена и вакцины.** Метод заключается в определении отсутствия роста бактериальной и грибковой микрофлоры в посевах образцов вакцины или вирусосодержащей суспензии, или антигена на питательных средах. Для испытания на стерильность пробу вакцины или вирусосодержащей суспензии встряхивают и проводят посев. В посевах не должно быть роста бактериальной и грибковой микрофлоры.

**Определение титра инфекционности на мышатах-сосунах 4-6-ти дневного возраста.** Мышата 4-6-ти дневного возраста высокочувствительны к вирусу ящура. Титрование вируса основано на

гибели мышат при заражении их вирусосодержащим материалом.

**Контроль на авирулентность проводили на мышатах-сосунах.**

**Контроль на иммуногенность.** Моновалентную вакцину, взятую в асептических условиях из реактора, изучают на иммуногенность на морских свинках.

**Определение иммуногенности вакцины.** 50% конечное разведение ( $KP_{50}$ ) референс-вакцины и  $KP_{50}$  испытуемой вакцины рассчитывали, используя метод Рида и Менча.

**Статистическая обработка результатов.** При анализе и обобщении результатов исследований нами использовались методы, описанные в руководстве по биометрии (И.П.Ашмарин, А.А.Воробьев, 1962).

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1. Культивирование вируса ящура**

Ящур в нашей республике с 2004 года протекает как эпизоотия. В период с 1999 по 2009 зарегистрировано 3 эпидемии ящура, с заносом новых связей и подтипов. Прозрачность границ, предрасполагающие природно-климатические условия, расширение торговых путей, а также соседство с неблагополучными по ящуру республиками обусловило занос данных типов и подтипов извне в нашу республику.

Анализ и мониторинг эпизоотической ситуации по ящуру в Кыргызской Республике на основании ветеринарной отчетности указывает на то, что ряд последних вспышек ящура типов А, О и Азия-1 был обусловлен антигенно-измененными штаммами вируса. Из этого следует необходимость проведения систематических мониторинговых исследований. И при возникновении новых случаев заболевания требуется оперативное выделение изолятов и изучение, степени их соответствия производственным штаммам, используемым для изготовления противоящурных вакцин.

В Кыргызстане эпизоотическая ситуация по ящуру остается напряженной, в том числе в сопредельных и приграничных странах. Зная о циркуляции вируса ящура типов О и А в предыдущие годы в государствах Центральной Азии, недостаточность профилактических прививок против них и отсутствие иммунитета у части популяции животных, вероятность заноса ящура в приграничные регионы Кыргызстана сохраняется.

Вирус ящура хорошо размножается в различных системах как «in vivo» так и «in vitro», в организме сельскохозяйственных и лабораторных



животных, в культурах тканей и клеток. Важным этапом при подготовке к производственному культивированию является адаптация вируса ящура к клеточным культурам. Штаммы этого вируса неодинаково ведут себя при адаптации и репродукции в культуре клеток. Поэтому условия их культивирования требуют индивидуального подхода.

Нами проведено адаптирование афтозного материала к культуре клеток. Изучено, изменение выхода вируса в зависимости от продолжительности пассирования. Для этой цели нами были отобраны афты от больных животных Чуйской области.

Для начала работ по культивированию проведены серологические исследования вируса ящура типа А<sub>22</sub> №550 и вируса ящура типа А (Чуй 2002), афты от больного животного (КРС) из Чуйской области, с помощью методов РСК и ИФА (табл. 1).

**Таблица 1 - Серологические исследования сывороток крови и патологического материала**

№	Наименование материала	Метод исследования	
		РСК	ИФА
1	Штамм А <sub>22</sub> №550	1:4	1:16
2	Штамм А (Чуй 2002)	1:4	1:8
3	Афты КРС из Чуйской области	1:2	1:4

Вирус ящура типа А<sub>22</sub> №550 при серологическом исследовании методом ИФА показал высокие титры 1:16 в сравнении с вирусом ящура типа А (Чуй 2002) и афты КРС из Чуйской области.

Выделение вируса ящура связано с определенными трудностями. Не всегда удается адаптировать вирус ящура к культуре клеток. Кроме того, некоторые штаммы вируса ящура не дают выраженного цитопатического эффекта, что затрудняет контроль процесса выделения. В связи с этим была поставлена задача, подобрать оптимальную культуру клеток для выделения изолята вируса ящура.

При выделении изолята вируса ящура от овец были использованы культуры клеток ПЯ, ВНК-21, ТЯ. В каждой культуре клеток было проведено по 2 пассажа в 3-х повторностях. Наличие вируса в культурах проверяли по проявлению цитопатического действия и тестированием в РН и РСК.

Цитопатическое действие вируса четко не проявлялось ни в одной из испытанных культур клеток в течение 2-х пассажей. В связи с этим, на ВНК-21 было проведено еще 8 пассажей (табл. 2).

**Таблица 2 - Характеристики вируса ящура в культуре клеток ВНК-21 на уровне различных пассажей**

<b>Пассаж</b>	<b>Время появления ЦПД, ч</b>	<b>Титр инфекционности, lg ТЦД<sub>50</sub>/мл</b>
1	-	НТ
2	-	НТ
3	120	4,50±0,08
4	96	5,00±0,07
5	96	5,25±0,01
6	72	6,25±0,10
7	72	6,50±0,07
8	48	7,25±0,10
9	48	7,50±0,06
10	48	6,75±0,09

НТ – не тестировался

Было установлено, что титр инфекционности вируса в культуре клеток ВНК-21 постепенно увеличивался от третьего к восьмому пассажиру с 4,50 до 7,25 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, и оставался приблизительно на том же уровне в девятом и десятом пассажах (табл. 2). Время появления цитопатического действия уменьшалось от третьего до восьмого пассажа

от 120 до 48 часов и оставалось таким в девятом и десятом пассажах (табл. 2). Таким образом, в культуре клеток ВНК-21 был выделен полевой изолят вируса ящура, который стабильно нарабатывался в высоких титрах.

Производительными принято считать методы, основанные на получении вирусосодержащего материала суспензионным или псевдосуспензионным (на микроносителях) способом. Таким образом, суспензионное культивирование вирусов в клеточных культурах как первичных, так и в перевиваемых, остаются перспективными в будущем для производства вирусных вакцин.

В последние годы основным методом репродукции вируса ящура для получения инактивированных вакцин стал метод культивирования в культуре клеток. Для промышленного изготовления вакцин из культурального вируса наиболее приемлем метод суспензионного культивирования вируса на клетках ВНК-21.

В наших опытах культивирование клеток ВНК-21 в ферментерах большой емкости обеспечивало крупномасштабное промышленное производство вакцины против ящура и снижало ее затратность. Суспензию клеток с концентрацией 400-600 тыс.кл/мл при 90% и выше жизнеспособных клеток вносили в культиватор и культивировали при 37°C в течение 48-72 часов. Культивирование прекращали, когда достигали 4-5-ти кратного прироста клеток. Полученную биомассу клеток отстаивали при температуре 4-8°C в течение суток, удаляли ростовую среду, разбавляли осадок до 1,8-2,5 млн.кл/мл поддерживающей средой и вносили вирус из расчета 0,5-1,0 lg ЛД<sub>50</sub> на клетку. Для заражения культуры клеток использовали посевной вирус ящура типа А, полученный по нашей методике. В опытах установлено, что при заражении суспензионной культуры клеток урожай вируса в среднем составлял 5,58 lg ЛД<sub>50/0,03</sub> мл, а индекс иммуногенности в среднем был 2,63. При этом отмечено, что при суспензионном культивировании вируса ящура не наблюдалось снижения инфекционной активности и иммуногенности полученных вакцин.

### **3.2. Изучение иммунобиологических свойств вируса ящура типа А, репродуцированного в монослойной и суспензионной культурах клеток ВНК-21.**

Важным этапом при подготовке к производственному культивированию является адаптация вируса ящура к клеточным культурам. Штаммы этого вируса неодинаково ведут себя при адаптации и репродукции в культуре клеток. Поэтому условия их культивирования требуют индивидуального подхода.

Целью данного эксперимента было изучение иммунобиологических свойства вируса ящура в зависимости от технологии культивирования клеток (в матрасах или роллерах).

Для изготовления противоящурных вакцин использовали: вирус ящур, тип А, адаптированный к культуре клеток ВНК-21, с титром инфекционности – 6,0-6,5 lg ЛД<sub>50</sub>/мл, 10% суспензию афт.

Клетки ВНК-21 выращивали на среде Игла с 5% сыворотки в реакторах объемом 40-2000 литров в течение 14 дней при 37°C. Культивирование прекращали, когда концентрация клеток в конечном сосуде составляла 2,2 -3,0 млн/мл.

Культивирование вируса ящура проводили в монослойной культуре в матрасах и роллерах. В опытах изучалось влияние дозы заражения в матрасах и роллерах на свойства вируса и его урожай.

Для заражения культуры клеток использовали 10% суспензию вируса из афт (тип А). Множественность заражения 1,0; 0,5; 0,1; 0,01 ЛД<sub>50</sub> на клетку.

По завершению культивирования клеток в пробах определяли титр инфекционности на культурах клеток.

Из полученных расплодок вируса на культуре клеток готовили экспериментальные образцы противоящурной вакцины и определяли индекс иммуногенности. Результаты опытов приведены в диаграмме 1.

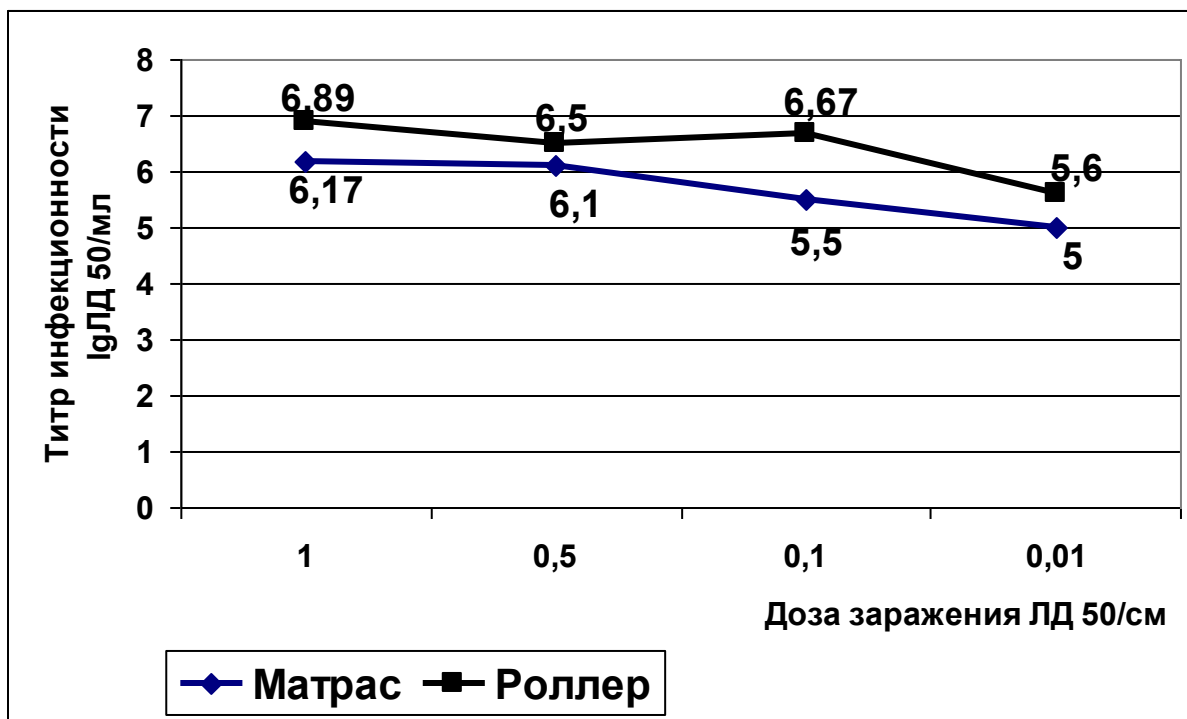


Диаграмма 1. Влияние дозы заражения на иммунобиологические свойства вируса

Как видно из диаграммы 1, после заражения монослойной культуры на матрасах при множественности заражения 1,0 ЛД<sub>50</sub> на клетку титр инфекционности полученной расплодки составил  $6,17 \pm 0,12$ , А при заражении 0,5 ЛД<sub>50</sub> на клетку титр инфекционности составил  $6,1 \pm 0,13$ . В сравнении, при заражении суспензионной культуры клеток на роллерах при множественности заражения 1,0 и 0,5 ЛД<sub>50</sub> на клетку результаты по титру инфекционности  $6,83 \pm 0,19$ . А при заражении 0,5 ЛД<sub>50</sub> на клетку титр инфекционности составил  $6,5 \pm 0,11$ . Из этого следует, что титр инфекционности при заражении суспензионной культурой клеток на роллерах выше, чем на монослойной культуре на матрасах. При снижении множественности заражения до 0,1; 0,01 снижаются титры инфекционности.

Нами усовершенствована технология подготовки посевного вируса. Для этого использовали матровый вирус для инфицирования суспензии клеток ВНК-21 при множественности заражения 0,1-0,01 ЛД<sub>50</sub>/кл в аппаратах КС-40, который предназначался для заражения клеток в больших объемах и приготовления противоящурной вакцины.

Подготовку посевного вируса в аппаратах КС-40 при суспензионном культивировании удалось осуществить в течение 48-96 часов.

Иммунобиологические свойства вируса полученного усовершенствованным способом отражены в таблице 3.

**Таблица 3 - Иммунобиологические свойства вируса, репродуцированного в суспензии клеток ВНК-21**

№ п/п	Титр инфекционности lg ЛД <sub>50/0,03</sub>	Индекс иммуногенности
1.	5,25	2,3
2.	6,0	3,1
3.	5,5	2,5
	$M \pm m = 5,58 \pm 0,24$ $p < 0,001$	$M \pm m = 2,63 \pm 0,26$ $p < 0,005$

Из таблицы 3 следует, что титр инфекционности составил 5,58, что в 1,1 раза выше, чем при роллерном культивировании. Индекс иммуногенности 2,63, т.е. в 1,3 раза выше, чем при роллерном культивировании.

Культивирование матрового вируса ящура в суспензионной культуре клеток ВНК-21, позволяет исключить роллерную подготовку вируса и сократить технологический цикл подготовки посевного вируса на 3-4 суток.

Использование усовершенствованной технологической схемы культивирования вируса ящура позволило обеспечить изготовление промышленных серий вакцины с высокими характеристиками (табл. 4).

**Таблица 4 - Иммунобиологические свойства вируса при промышленном культивировании в суспензии клеток ВНК-21**

№ серии	Титр инфекционности, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Индекс иммуногенности
сер.38	5,25	1,1
сер.39	5,0	1,03
сер.41	5,5	1,27
M ± m	5,25 ± 0,14 p < 0,01	1,13 ± 0,07 p < 0,001

Средний титр инфекционности по трем сериям составил 5,25 lgЛД<sub>50/0,03</sub> мл, а индекс иммуногенности 1,13.

На предложенный метод подготовки посевного вируса в аппаратах КС-40 для дальнейшего культивирования вируса в суспензии клеток ВНК-21 разработана нормативно-техническая документация (НТД). Он рекомендован в серийном производстве противоящурной культуральной вакцины.

### **3.3. Характеристика производственных и контрольных штаммов вируса ящура.**

Производственный штамм вируса ящура типа А Чуй 2002 депонирован в ЗАО «Алтын-Тамыр». Производственным штаммом считается вирус, адаптированный к культуре клеток ВНК-21 и проверенный в иммунологическом отношении. Штамм вируса ящура типа А «Чуй-2002» обладает характеристиками, указанными в табл. 5, которые определяются при закладке материала в банк производственных штаммов.

**Таблица 5 - Требования к производственному штамму культурального вируса ящура типа А**

№ пп	Показатели	Ед. изм.	Необходимые параметры
1	Время репродукции в культуре клеток	часы	18-48
2	Доза заражения	lg ЛД <sub>50</sub> /мл	не ниже 10 <sup>7,5</sup>
3	Титр инфекционности 10% вирус содержащей суспензии	lg ЛД <sub>50</sub> /мл	не ниже 10 <sup>7,5</sup>
4	Кол-во общего вирусного белка в	мкг/мл	не ниже 1,5

	10% вирусодержащей суспензии		
5	Кол-во 146S компонентов в 10% вирусодержащей суспензии	мкг/мл	не ниже 0,8
6	Типоспецифичность	Типовая принадлежность	типоспецифичен
7	Активность в РСК 35% вирусодержащей суспензии	РСК по 100 гемолизу	не ниже 0,8

Из производственного штамма «Чуй-2002» вируса ящура типа А готовят матриксную расплодку I, а из нее матриксную расплодку II, которую использовали для изготовления матриксной расплодки III.

При промышленной заготовке вирусного сырья для производства противоящурной вакцины используют матриксную расплодку III культурального вируса, прошедшего не более 12 пассажей на культуре клеток.

### **3.4. Отработка режима инаktivации вируса ящура.**

Инаktivация в аспекте практического применения вируса в качестве вакцины означает утрату вирусом способности репродуцироваться при сохранении антигенных свойств.

Основное требование к инаktivанту состоит в том, чтобы он, изменяя нуклеиновую кислоту вируса, существенно не нарушал свойств вирусного белка - носителя иммуногенности.

В наших исследованиях была изучена динамика инаktivации культурального вируса ящура штамма «Чуй 2002» димер этиленимином. Определена  $K_{50}$  - концентрация инаktivанта, обеспечивающая снижение инфекционности вирусодержащей суспензии до 1 ЛД<sub>50/0,03</sub> мл в течение заданного времени, температуры, рН среды.

Для инаktivации вируса ящура использовали димер этиленимина (ДЭИ), рабочий раствор которого готовили за 30-60 минут до внесения в вирусодержащую суспензию. Для этого исходный препарат разбавляли стерильной деминерализованной водой до 5-10% концентрации. Величину рН рабочего раствора ДЭИ доводили до 7,8-8,3 раствором уксусной кислоты (5М). Не охлаждая вирусодержащую суспензию после культивирования, в нее добавляли рабочий раствор ДЭИ до конечной концентрации 0,2-0,3%.

Инаktivацию проводили в течение 24 часов при температуре 36-37°C и при величине рН 6,5-7,4.

В случаях, когда приходилось использовать охлажденную вирусодержащую суспензию, ее предварительно подогревали до температуры 36-37°C и затем добавляли рабочий раствор инаktivанта. После окончания процесса инаktivации проверяли полноту инаktivации

вируса ящура. Для этого использовали культуры клеток и серологические реакции.

Изучали влияние величины рН среды на процесс инактивации вируса ящура димерэтиленимином. Для этого уровень рН в четырех пробах суспензии установили в диапазоне 7,2 - 7,4, и в четырех других пробах - 6,5-6,9. Результаты опытов обобщены в табл. 6.

**Таблица 6 – Влияние рН среды на процесс инактивации вируса ящура ДЭИ**

рН среды	K <sub>50</sub> в %			
	факт.	M ± m		
7,2 - 7,4	0,005	0,004 ± 0,00036 p < 0,001		p < 0,001
	0,003			
	0,004			
	0,0041			
6,5 - 6,9	0,004	0,0031 ± 0,0037 p < 0,001	1,3 0,0003	p < 0,001
	0,0039			
	0,0043			
	0,0029			

Данные табл. 6 показывают, что K<sub>50</sub> при рН среды 7,2-7,4 составила 0,004%, а при рН 6,5 - 6,9 - 0,0031%. Таким образом, при инактивации суспензии в кислой среде требуется димера этилениминына в 1,3 раза меньше.

Скорость инактивации при концентрации ДЭИ 0,2%, температуре 37°С составила 2 lg ЛД<sub>50/0,03</sub> мл в час.

K<sub>50</sub> была в 45-50 раз ниже концентрации димера этилениминына, выбранной для инактивации вируса ящура при производстве противоящурной вакцины.

Во второй серии опытов было изучено влияние уровня концентрации димера этилениминына на иммуногенность вакцин. Для этого были взяты три показателя концентрации димера (0,05; 0,1 и 0,2%) и каждая была введена в четыре пробы суспензии. После инактивации были



приготовлены вакцины и определен индекс их иммуногенности на морских свинках. Результаты опытов приведены в таблице 7.

Таблица-7- Влияние концентрации ДЭИ на иммуногенность вакцин

Конц. ДЭИ в %	Индекс иммуногенности вакцин для морских свинок	Уровень значимости
0,05	1,0 0,87 0,94 $M_{\pm m} = 1,00 \pm 0,07$ 1,2	$p < 0,005$
0,1	1,1 0,9 0,75 $M_{\pm m} = 0,90 \pm 0,07$ 0,86	$p < 0,001$
0,20	1,2 1,0 0,7 $M_{\pm m} = 0,95 \pm 0,106$	$p < 0,001$

Как видно из данных табл. 7, рост концентрации димера этиленimina в 4 раза не привел к значительному снижению иммуногенности вакцин. В опытах было установлено, что оптимальной концентрацией ДЭИ для инактивации вируса ящура является 0,05%.

В следующей серии опытов было изучено влияние концентрации инактиванта (ДЭИ) на иммуногенность культуральной противоящурной вакцины. Для этого были приготовлены 5 опытных серий вакцин (из вирусодержащей суспензии с титром инфекционности 5,16 ЛД<sub>50/0,03</sub> мл),

в которых концентрация инактиванта была различной (0,1; 0,2; 0,3%) и был использован различный режим инаktivации. В трех сериях инаktivацию вакцины вели 24 часа при температуре 27°C и брали различное количество инаktivанта, а в двух сериях при концентрации инаktivанта 0,2% инаktivацию вели при 37°C в течение 24 часов. Во всех сериях вакцин был определен индекс иммуногенности. Результаты опытов обобщены в таблице 8.

**Таблица 8 - Влияние концентрации инаktivанта на иммуногенность вакцины**

№ п/п	Титр инфекционности lg ЛД <sub>50/0,03</sub> мл	Режим инаktivации вируса ящура	Индекс иммуногенности
1.	5,16	0,1% ДЭИ 24 часа при 27°C	3,1
2.	5,16	0,2% ДЭИ 24 часа при 27°C	4,4
3.	5,16	0,3% ДЭИ 24 часа при 27°C	5,4
4.	5,16	0,2% ДЭИ 24 часа при 37°C	4,6
5.	5,16	0,2% ДЭИ 24 часа при 37°C	5,0

Как видно из данных таблице 8, иммуногенная активность разных серий противоящурных вакцин при различной концентрации инаktivанта и разных режимах инаktivации, сохраняется на высоком уровне.

Таким образом, установлено, что димер этиленimina инаktivирует вирус ящура при широком диапазоне величин рН, а также при различных концентрациях инаktivанта и при температуре 27-37°C. Эти факты необходимо учитывать при получении вакцин высокого качества.

В следующих опытах изучали влияние различных концентраций ДЭИ на иммуногенные свойства вируса ящура. Для этого каждую концентрацию ДЭИ создавали в трех образцах вакцины (табл. 9).

**Таблица 9 - Влияние концентрации ДЭИ на иммуногенные свойства вируса ящура**

Концентрация	Иммуногенная активность вакцин
--------------	--------------------------------

ДЭИ %		
0,05	0,50 0,44 0,55	$M \pm m = 0,50 \pm 0,031$ $p < 0,001$
0,3	0,44 0,50 0,48	$M \pm m = 0,47 \pm 0,020$ $p < 0,001$
0,5	0,51 0,37 0,50	$M \pm m = 0,46 \pm 0,052$ $p < 0,001$

Как видно из данных таблице. 9, увеличение концентрации ДЭИ от 0,05 до 0,5% (в 10 раз) не снизило иммуногенной активности вакцины.

#### **4. ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПРОТИВОЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЫ ТИПА А «Чуй 2002»**

##### **4.1. Концентрирование вируса ящура при изготовлении вакцины**

Для снижения прививной дозы вакцины, а так же при составлении поливалентных вакцин необходимо концентрировать вирус.

Главным требованием, предъявляемым к методам по концентрированию вируса, является создание условий сохранения основных иммунобиологических свойств исходного вируса. В нашей работе были испытаны два метода концентрирования: ультрафильтрация и адсорбция на гидроокиси алюминия.

Ультрафильтрацию осуществляли на фильтрующих модулях БТУ-0,5-2,0. Концентрирование вирусосодержащей суспензии до и после инактивации проводили в 5 и 10 раз по объему при давлении 1,5 атм. Для этого перед концентрированием определяли титр инфекционности и количество белка в исходных пробах. Затем проводили концентрирование и брали пробы для определения титра инфекционности и количества белка. Опыты провели в трех повторностях. При этом определяли производительность процесса концентрирования, как при ультрафильтрации, так и при адсорбции. Результаты опытов по концентрированию культурального вируса ящура приведены в таблице 10.

Таблица 10 - **Концентрирование культурального вируса ящура методом ультрафильтрации**

Кол-во	Кратность	Титр инфекционности	Производительность
--------	-----------	---------------------	--------------------

опытов	концентр. (раз)	(lg ЛД <sub>50</sub> /мл)	концентрирования
1	исход. 0	6,5	
2		6,0	
3		6,0	
		$M \pm m = 6,17 \pm 0,194$	
		$p < 0,01$	
1	5	6,75	200 дм <sup>3</sup> /м <sup>2</sup> .ч
2		6,5	
3		6,0	
		$M \pm m = 6,42 \pm 0,24$	
		$p < 0,001$	
1	10	7,5	100 дм <sup>3</sup> /м <sup>2</sup> .ч
2		6,5	
3		7,0	
		$M \pm m = 7,0 \pm 0,29$	
		$p < 0,001$	

Производительность процесса составила 9 литров в час.

Опыты по концентрированию вируса ящура, так и его антигена методом ультрафильтрации показали, что можно получить препараты с активностью вируса значительно выше исходного. При этом потери вируса незначительные. Однако производительность процесса ультрафильтрации невысокая и поэтому при концентрировании больших объемов вирусосодержащего материала или антигена этот процесс занимает много времени.

Опыты по концентрированию показали, что, несмотря на длительность процедуры, иммунобиологические свойства вируса ящура сохраняются. Преимуществ по производительности очистки и концентрирования суспензии до и после инактивации не наблюдали.

Поэтому в дальнейшей работе при производстве противоящурных вакцин возникла необходимость в изучении возможности использования метода очистки и концентрирования вируса ящура адсорбцией на гидроокиси алюминия.

При этом необходимо подобрать оптимальный уровень концентрации гидроокиси алюминия, который бы обеспечивал полную адсорбцию вируса и не влиял на его свойства. А также предстояло установить величину рН среды, при которой происходит максимальная адсорбция вируса или антигена.

Для этого было проведено изучение влияния рН среды и концентрации гидроокиси алюминия на адсорбцию вируса ящура. Результаты приведены в таблице 11.

**Таблица 11 - Адсорбция вируса ящура в зависимости от рН среды и концентрации ГОА**

рН	Титр инфекционности (lg ЛД <sub>50/0,03</sub> мл)
----	---

среды	Концентрация ГОА в %			
	0	5	10	20
5,0-5,5	5,5	2,0	2,0	2,0
	5,0	2,0	1,5	1,5
	5,25	1,5	1,0	1,5
	$M_{\pm m}=5,25 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$M_{\pm m}=1,83 \pm 0,19$ $p < 0,01$	$M_{\pm m}=1,5 \pm 0,29$ $p < 0,01$	$M_{\pm m}=1,67 \pm 0,19$ $p < 0,01$
7,1-7,3	5,0	2,75	2,75	2,75
	5,5	2,5	2,5	2,25
	5,25	3,0	2,75	2,5
	$M_{\pm m}=5,25 \pm 0,14$ $p < 0,01$	$M_{\pm m}=2,75 \pm 0,14$ $p < 0,001$	$M_{\pm m}=2,67 \pm 0,11$ $p < 0,001$	$M_{\pm m}=2,5 \pm 0,14$ $p < 0,001$
8,1-8,3	3,75	3,75	3,5	3,0
	4,5	4,0	4,0	2,75
	5,0	4,0	3,5	3,0
	$M_{\pm m}=4,42 \pm 0,38$ $p < 0,005$	$M_{\pm m}=3,92 \pm 0,09$ $p < 0,01$	$M_{\pm m}=3,67 \pm 0,19$ $p < 0,001$	$M_{\pm m}=2,92 \pm 0,09$ $p < 0,01$

Опыты в трех повторностях проводили при рН среды от 5,0 до 8,3, а концентрацию гидроокиси алюминия брали 150; 300; 600 мг. Результаты опытов приведены в таблице 11.

Как видно из данных в табл.11, адсорбция вируса ящура идет значительно активнее в кислой зоне рН, чем в щелочной. С помощью адсорбции на ГОА концентрирование вируса проходило в 5-10 раз активнее и без значительных потерь.

В следующей серии опытов была изучена иммуногенная активность вакцин концентрированных адсорбцией на ГОА. Опыты проведены в трех повторностях. Вначале определили индекс иммуногенности на белых мышцах массой 10-12 г, которая не подвергалась концентрированию.

Затем суспензию концентрировали в 5 и 10 раз адсорбцией на ГОА и также определяли индекс иммуногенности. Результаты иммуногенной активности концентрированных вакцин подтвердили ранее проведенные исследования. Результаты опытов приведены в таблице 12.

Таблица 12 - Иммуногенная активность вакцин, концентрированных адсорбцией на ГОА

Кратность концентрирования	Индекс иммуногенности
0	0,67
	0,56
	0,72
	$M_{\pm m} = 0,65 \pm 0,05$ $p < 0,005$
	3,22

5	3,5 3,8	$M \pm m = 3,51 \pm 0,17$ $p < 0,001$
10	6,5 7,0 7,12	$M \pm m = 6,87 \pm 0,21$ $p > 0,01$

Данные табл.12 свидетельствуют, что потерь вируса при концентрировании не происходит. Иммуногенная активность вакцины возрастала пропорционально кратности концентрирования.

### Технические требования

Вакцина против ящура типа А штамма «Чуй-2002» из культурального вируса по своим физическим и иммунобиологическим свойствам соответствует требованиям, предъявляемым к вакцинам данного типа (табл. 13).

Таблица 13 – Характеристика инактивированной культуральной вакцины

Наименование показателей	Характеристика показателей	Метод испытаний
Внешний вид	Бесцветная или серовато-зеленого цвета жидкость с осадком адсорбента, который легко разбивается в равномерную взвесь при встряхивании	Бесцветная жидкость
Наличие посторонних примесей, плесени, трещин флаконов	Не допускается	Отсутствует
Стерильность	Допускается наличие не патогенной для животных микрофлоры	Стерильна
Безвредность и токсичность	Безвредна, не токсична	Соответствует
Авирулентность	Авирулентна	Авирулентна
Иммуногенность	Иммуногена. Должна содержать в прививном объеме не менее 7 фактических ИмД <sub>50</sub> (3 гарантированных ИмД <sub>50</sub> КРС) или не менее 20 ИмД <sub>50</sub> МС по	Не менее 20 ИмД <sub>50</sub> МС

## ВЫВОДЫ

1. Усовершенствован метод культивирования вируса ящура в суспензионной культуре клеток ВНК-21, обеспечивающий высокий «урожай» вируса 5,58 lg ЛД<sub>50/0,03</sub> мл и обладающего высокими иммунобиологическими свойствами в среднем 2,63 ИмД<sub>50</sub>.
2. Установлено, что иммунобиологические свойства вируса не изменяются в зависимости от системы культивирования в монослойной и суспензионной 4,05 JJ и 4,2 JJ соответственно.
3. Усовершенствован метод инактивации вируса ящура при помощи 0,2% ДЭИ при температуре 37°C в течение 24 часов. При этом индекс иммуногенности составил 5,0 JJ.
4. Оптимизированы условия концентрирования антигена вируса ящура при производстве культуральных противоящурных вакцин с помощью адсорбции и ультрафильтрации. С помощью адсорбции на гидроокиси алюминия концентрирование вируса проходит в 5-10 раз активнее и без значительных потерь.
5. Установлено, что при различных температурах хранения культуральной противоящурной вакцины индекс иммуногенности при ультрафильтрации составляет 5,17 JJ и при адсорбции на ГОА 3,43 JJ.
6. Полученная по усовершенствованной технологии культуральная вакцина против ящура из вируса типа А штамма "Чуй 2002", культивируемого в суспензии клеток ВНК-21, при лабораторных испытаниях оказалась безвредной и высокоиммуногенной.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

По материалам диссертации подготовлены, апробированы и предлагаются для практики следующие методики:

- методика подготовки посевного вируса ящура для культивирования в промышленных масштабах;
- методика инактивации культурального вируса ящура димер этиленимином.

Усовершенствованы методы по культивированию вируса ящура, очистке и концентрированию вирусосодержащей суспензии, инактивации вируса, которые могут использоваться для производства культуральных противоящурных вакцин.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нургазиев, Р.З. Предотвращение риска возникновения ящура / Р.З. Нургазиев, Е.Д. Крутская, А.Р. Нургазиева // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина, посвященный 60-летию д.в.н. профессора К.С. Арбаева. – Бишкек, 2009.- № 4. – С. 46-48.
2. Нургазиева, А.Р. Чувствительность ПЦР анализа при выделении вируса ящура / А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки. – Бишкек, 2009. - № 1. – С. 154-156.
3. Джапаралиев, Н.Т. Изучение иммуно-биологических свойств вируса ящура репродуцированного в монослойной культуре клеток/ Н.Т. Джапаралиев, А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки. – Бишкек, 2010. - № 2. – С. 56-59.
4. Нургазиева А.Р. Вакцинопрофилактика ящура / А.Р. Нургазиева// Вестник Сельскохозяйственной науки. – Бишкек, 2010. - № 3. – С. 70-73.
5. Нургазиева, А.Р. Адаптация изолята вируса ящура типа А на культурах клеток / А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки Казахстана. – Алмата, 2011.- №623 – С. 83-84.
6. Нургазиева, А.Р. Выделение вируса ящура типа А в культуре клеток / А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки Казахстана. – Алмата, 2011. - №624. – С. 63-64.
7. Джапаралиев, Н.Т. Изготовление противоящурной экспериментальной вакцины типа А из штамма «Чуй – 2002» /Н.Т. Джапаралиев, А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки. – Бишкек, 2011. - № 4. – С. 157-160.
8. Джапаралиев, Н.Т. Контроль противоящурной экспериментальной культуральной вакцины типа А из штамма «Чуй 2002» / Н.Т. Джапаралиев, А.Р. Нургазиева // Вестник Сельскохозяйственной науки. – Бишкек, 2011. - № 5. – С. 177-180.
9. Нургазиев, Р.З. Культивирование вируса ящура типа А из штамма «Чуй 2002» / Р.З. Нургазиев, Н.Т. Джапаралиев, Нургазиева А.Р // Известия НАН КР. – Бишкек, 2011. - №3. – С. 63-64.

Нургазиева Асел Рысбековнанын «Шарптын А тибине каршы "ЧУЙ 2002" штаммынан жасалган культуралдык, инактивалдык вакцинанын биотехнологиясы» темасында биология илимдеринин кандидаты даражасын коргоочу диссертациясынын 06.02.02 –



ветеринардык микробиология, вирусология, эпизоотология, микология менен бирге микотоксикология жана иммунология адистиги боюнча

## РЕЗЮМЕСИ

**Негизги сөздөр:** шарп, штамм, ВНК-21, адаптация, ДЭИ, пассаж, титр, иммуногендүүлүк, инфекциондук, инактивант, адсорбция, антитело.

**Изилдөөнүн объектиси:** патологиялык материал (афта), малдардын канынын сары суусу, шарп вирусунун штаммы, культуралдык вакцина.

**Иштин максаты:** ВНК-21 суспензиялык культуралдык клеткасынан даярдалган вирустун шарп ылаңына каршы вакцинанын өндүрүүнүн технологиясы өздөштүрүлгөн.

**Изилдөөнүн ыкмалары:** серологиялык, молекулярдык-биологиялык, иммунобиологиялык, вирусологиялык.

**Алынган натыйжалар жана алардын жаңычылыгы:** Вирустун ВНК-21 суспензиялык культуралдык клеткасында культуралоо ыкмасы өнөр жайында өздөштүрүлдү. ВНК-21 суспензиялык клеткасында өстүрүлгөн вирустан жасалган шарп ылаңына каршы инактивацияланган культуралдык вакцинаны иммуногендик касиети лаборатордук жана өнөр жай шартында текшерилген.

**Колдонуу чөйрөсү:** вирусологиялык жана ветеринардык практика.

## РЕЗЮМЕ

диссертации Нургазиевой Асел Рысбековны на тему:  
**«БИОТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ  
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЯЩУРА ТИПА А ИЗ ШТАММА "ЧУЙ  
2002"»**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

**Ключевые слова:** ящур, штамм, ВНК-21, адаптация, вакцина, пассаж, титр, иммуногенность, инфекционность, инактивант, адсорбция, антитело.

**Объект исследования:** патологический материал (афты), сыворотка крови животных, штамм вируса ящур, культуральная вакцина.

**Цель работы:** усовершенствование технологии производства вакцины против ящур из вируса, репродуцированного в суспензионной культуре клеток ВНК-21.

**Методы исследований:** серологический, молекулярно-биологический, иммунобиологический, вирусологический.

**Полученные результаты и их новизна:** усовершенствован метод культивирования вируса ящура в суспензии культур клеток ВНК-21 в промышленных условиях. Разработана культуральная инактивированная вакцина против ящура в лабораторных опытах и производственных проверках подтверждены высокие иммуногенные свойства инактивированной культуральной противоящурной вакцины.

**Область применения:** вирусология и ветеринарная практика.

## RESUME

Nurgazieva Asel Rysbekovna

dissertation on a theme "**Biotechnology culture Inactivated vaccines against FMD type A strain of "Chuy 2002"**" on competition of a scientific degree of the candidate of biology sciences on a speciality 06.02.02 - veterinary microbiology, virology, epizootology, micology with micotoxicology and immunology.

**Keywords:** FMD, strain, BHK 21, adaptation, vaccine, passage, titer, immunogenicity, infectivity, inaktivant, adsorption, antibody.

**Object of research:** pathological material (aphthas), whey of blood of animals, strain of FMD virus, cultural vaccine.

**The work purpose:** The purpose of the improvement in technology was the production of vaccine against foot and mouth disease from the virus reproduce in suspension culture of BHK-21 cells.

**Research methods:** serological, molecular biological, immunological, biological, virological.

**The received results and their novelty:** Improved method for culturing the virus in suspension cultures of BHK-21 cells in an industrial environment. In laboratory and field conditions tested immunogenic properties of inactivated culture vaccine made from virus grown in BHK 21 cell suspension.

**Scope:** virology and veterinary practice.