

На правах рукописи



Алексеевкова Светлана Валерьевна

**ЛАБОРАТОРНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУНОГЕННОСТИ
ВАКЦИН ПРОТИВ РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией, иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. A.', is positioned below the title and author information.

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней лошадей и крупного рогатого скота отдела вирусологии ГНУ «Всероссийский научно – исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им Я Р Коваленко» (ВИЭВ) Российской Академии сельскохозяйственных наук

Научный руководитель – заведующий отделом вирусологии ВИЭВ, доктор ветеринарных наук, Заслуженный деятель науки РФ, лауреат Премии Совета Министров СССР, лауреат премии Республики Саха (Якутия), профессор **Константин Павлович Юров**

Официальные оппоненты

1 Белоусова Раиса Васильевна - доктор ветеринарных наук, профессор (ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им К И Скрябина»)

2 Василий Николаевич Лазарев – кандидат биологических наук (ФГУ «Научно - исследовательский институт физико - химической медицины» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию)

Ведущее учреждение – ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ)

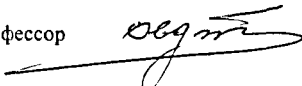
Защита состоится « 16 » мая 2007 г в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006 033 01 по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора наук при ГНУ Всероссийский научно – исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им Я Р Коваленко (ВИЭВ) Российской Академии сельскохозяйственных наук по адресу 109428, Москва, Рязанский проспект д 24 корп 1, ВИЭВ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Всероссийский научно – исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им Я Р Коваленко» (ВИЭВ)

Автореферат разослан « 11 » апреля 2007 г

Учёный секретарь

диссертационного совета, профессор



Н П Овдиенко

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Вirus герпеса лошадей 1 типа – возбудитель широко распространённой инфекции лошадей. Основными клиническими формами заболевания, вызываемого ВГЛ-1, являются аборт, миелоэнцефалопатия, респираторный синдром, кератоконъюнктивиты.

В последние годы герпесвирусная миелоэнцефалопатия в США и странах Европы получила широкое распространение, несмотря на масштабную программу вакцинопрофилактики болезни. Неэффективность специфической профилактики неврологической формы ВГЛ-1 приводит к тому, что в период энзоотических вспышек заболеваемость лошадей достигает 90 %, смертность может составить до 50 %.

При этом нет единого мнения по вопросу патогенеза миелоэнцефалопатии ВГЛ-1 инфекции. Предполагают, что симптомокомплекс болезни формируется в результате воспаления и тромбоза мелких кровеносных сосудов под влиянием образующихся цитотоксических иммунных комплексов, что приводит к гипоксической дегенерации клеток головного мозга. Результаты иммуногистохимических исследований свидетельствуют о локализации вирусного антигена главным образом в клетках эндотелия артериол и капилляров (Edington et al., 1986), однако, при этом удалось подтвердить гибридизацией *in situ* и иммуногистохимическими методами инфекцию нейронов и астроцитов (Schmidt et al., 1994). Ряд авторов полагают, что вакцинация способна усилить формирование цитотоксических иммунных комплексов и повысить шанс проявления миелоэнцефалопатии в результате нарушения функции кровеносных сосудов головного мозга (Allen GP, Kydd JH, Slater JD, et al., 2002).

Другое мнение заключается в том, что в популяции лошадей появляются новые доминантные штаммы ВГЛ-1 с мутацией генов, кодирующих вирусную ДНК – полимеразу, ранее не регистрировавшиеся. Новые энзоотические штаммы ВГЛ-1 характеризуются также чрезвычайно важным свойством – способностью к преодолению видового барьера (известны случаи энцефалитов с летальным исходом у газелей, антилоп, зебр, жирафов) и высокой вирулентностью для естественновосприимчивых животных (Nugent et al., 2006). Как правило, интродукция ВГЛ-1 в гетерологичную популяцию животных сопровождается летальностью до 100 %.

Представленные данные свидетельствуют об актуальности исследований, направленных на совершенствование средств специфической профилактики инфекции. Учитывая экономический фактор, естественно восприимчивые животные (лошади) в экспериментальной работе могут быть использованы в весьма ограниченном количестве. Эффективное решение может быть достигнуто путем моделирования инфекционного

процесса на лабораторных животных для последующей работы по изучению напряженности вакцинального иммунитета

Проведённые ранее исследования на сирийских хомяках (E Doll et al, 1953) показали, что ВГЛ-1 не обладает для хомяков (в отличие от лошадей) эндотелиотропными свойствами. Интрацеребральная инокуляция адаптированного штамма Куд ВГЛ-1 хомякам вызывала энцефалит, характеризуемый репликацией вируса в нейронах и глиальных клетках. По мнению большинства исследователей такая лабораторная модель имеет ограниченное использование при выяснении ряда вопросов патогенеза и иммуногенеза инфекции ВГЛ-1.

Рядом работ (A R Awan et al, 1990, A Kukreja et al, 1998, R Hasebe et al, 2002, A R J Frampton et al, 2004, N Virmani et al, 2005) было показано, что при экспериментальном заражении ВГЛ - 1 мышей линии BALB/c удастся воспроизвести инфекционный процесс достаточно приближенный к естественному заболеванию лошадей.

Моделирование на лабораторных животных иммунной реакции на различные препараты герпесвируса лошадей с целью изучения особенностей иммунного ответа, обусловленного различной природой использованных вирусных препаратов, представляет значительный интерес. Успешное решение ряда аспектов этой задачи позволяет существенно продвинуться в познании иммуногенеза при герпесвирусной инфекции лошадей, что обеспечивает перспективу создания более эффективных и безопасных средств специфической профилактики болезней.

Цель работы - разработать лабораторную модель ВГЛ - 1 инфекции и изучить особенности формирования гуморальных реакций и устойчивости к ВГЛ-1 на введение различных вирусных антигенов.

Задачи исследования

- определить в ИФА, РН, РТГА возможность индуцирования гуморального иммунного ответа у мышей на введение инактивированного вируса, аттенуированного вируса и рекомбинантной плазмиды p1YT 1, содержащей в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1,
- провести сравнительный анализ динамики формирования гуморального иммунного ответа у мышей линии BALB/c после введения рекомбинантной конструкции p1YT 1, экспрессирующей гликопротеин D ВГЛ-1, инактивированного ВГЛ-1 и вакцинных штаммов ВГЛ-1 «CB/69» и «RhinoImune»,
- изучить антигенные свойства вакцинных препаратов при использовании различных схем иммунизации,
- изучить чувствительность мышей к ВГЛ-1 при различных способах заражения,

- провести селекцию вирулентного штамма ВГЛ-1 для последующей работы по изучению напряженности вакцинального иммунитета у мышей,
- изучить напряженность иммунитета у мышей в зависимости от природы антигена, дозы антигена, кратности иммунизации и способа контрольного заражения

Научная новизна исследования

Впервые изучены иммуногенные свойства рекомбинантной плазмиды pIYT 1, содержащей в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1, в сравнении с аттенуированным и инактивированным ВГЛ-1 на мышах линии BALB/c Установлено, что рекомбинантная плаزمида pIYT 1 вызывает образование специфических антител к вирусу в титрах, сопоставимых с реакцией на аттенуированный или инактивированный ВГЛ-1 Антитела могут быть выявлены в РН, РТГА и ИФА Изучена динамика формирования иммунного ответа в зависимости от природы антигенов

Впервые разработана лабораторная модель неврологической формы ВГЛ-1 инфекции на мышах линии BALB/c Полученный селекцией штамм «ПП1/1» ВГЛ-1, патогенный для мышей в возрасте до 40 дней, вызывает у них геморрагический энцефалит с летальным исходом до 100% после интраназальной или интрацеребральной инокуляции

Впервые изучены abortогенные свойства типичного эпизоотического штамма «ПП1» ВГЛ-1, циркулирующего на территории РФ, для лабораторных животных Показано, что у беременных мышей линии BALB/c штамм «ПП1» после подкожной инокуляции вызывает гибель эмбрионов с последующей их резорбцией или рождение нежизнеспособного приплода

Впервые на модели неврологической и abortогенной форм ВГЛ-1 инфекции на мышах линии BALB/c изучена напряженность иммунного ответа в зависимости от природы антигенов, дозы антигенов, кратности иммунизации и способа контрольного заражения

Обнаружено усиление иммунного ответа при комбинированном введении рекомбинантной плазмиды pIYT 1 и вакцинного штамма «СВ/69»

Практическое значение работы

Проведённые исследования позволяют рекомендовать лабораторные модели неврологической и abortивной форм ВГЛ-1 инфекции для оценки иммуногенности вакцин методом контрольного заражения Полученный в ходе работы штамм нейровирулентный для мышей линии BALB/c может использоваться для изучения патогенеза ВГЛ-1 и эффективности антивирусной терапии

Разработаны (в соавторстве) «Рекомендации по получению рекомбинантных плазмид, содержащих гены гликопротеинов вируса ринопневмонии лошадей, и их применению с

использованием оптимальных доз для иммунизации восприимчивых лабораторных животных», утвержденные директором ВИЭВ в 2007 г

Разработана (в соавторстве) «Временная инструкция по ретроспективной диагностике ринопневмонии лошадей (выявление специфических антител) иммуноферментным анализом», утвержденная директором ВИЭВ в 2007 г

Материалы диссертации использованы в дополнении, подготовленном Референтной лабораторией МЭБ по ринопневмонии лошадей (эксперт К П Юров) для нового издания «Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines», раздел Equine diseases in list B, глава Equine rhinopneumonitis, Office International des Epizooties

Основные положения, выносимые на защиту

- экспериментальные данные, характеризующие иммунный ответ у лабораторных животных - мышей линии BALB/c, на различные иммуногены ВГЛ 1 коммерческие вирусвакцины против ринопневмонии лошадей «CB/69» и «Rhinomune», инактивированный вирус и рекомбинантную плазмиду pIYT 1, содержащую в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1,

- антигенные свойства препаратов ВГЛ - 1 при использовании различных схем иммунизации,

- селекция вирулентного штамма ВГЛ-1 для последующей работы по изучению напряженности вакцинального иммунитета у мышей,

- рекомендации по контролю иммуногенной активности препаратов против ринопневмонии лошадей в лабораторных условиях

Апробация работы

Материалы работы были представлены на 2-м Московском международном Конгрессе «БИОТЕХНОЛОГИЯ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ» Секция 2 – Биотехнология и сельское хозяйство (Москва, 2003), на Международной научной конференции «Современные достижения и проблемы клеточной биотехнологии и иммунологии в ветеринарной медицине» (Москва, 2003), на Международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань, 2005) Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном научно-производственном совещании научных сотрудников ГНУ ВИЭВ им Я Р Коваленко (Москва, 2007 г)

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 149 страницах машинописного текста и состоят из следующих разделов введение, обзор литературы, результаты исследования, обсуждение

выводы, практические предложения, список литературы и приложения. Список литературы содержит 132 источника. Диссертация иллюстрирована 5 таблицами, 18 рисунками.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы

В работе использовали штаммы ВГЛ-1 из музея отдела вирусологии ВИЭВ - эпизоотический штамм вируса герпеса лошадей 1 типа «ПП1», изолированный в 2000 г от лошадей при вспышке абортуса и поражения центральной нервной системы в виде пареза задних конечностей и 2 вакцинных штамма - штамм «СВ/69» – производственный вакцинный штамм ВГЛ-1 (получен К.П. Юровым) и штамм «RhinoTune», выделенный из коммерческой вакцины «RhinoTune» производства фирмы «Pfizer», США).

Рекомбинантная плазмида pIYT 1, содержащая в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1, была сконструирована в ходе совместной работы (Ткачёв И.Ю. и др., 2003) сотрудников лаборатории молекулярной биологии и генной инженерии микроорганизмов ВНИИСХБ и лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней крупного рогатого скота и лошадей отдела вирусологии ВИЭВ. Нарращивание и очистку рекомбинантной плазмиды проводил научный сотрудник отдела вирусологии ВИЭВ И.Ю. Ткачёв.

Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии BALB/c массой 3 – 25 г, предоставленных нам отделом разведения лабораторных животных ГУ Российский онкологический центр имени Н.Н. Блохина РАМН.

Для экспериментов *in vitro* использовали диплоидную культуру клеток почки кролика (RK-13), перевиваемую культуру клеток почки теленка (ППП) из банка клеточных культур ВИЭВ.

Иммунопероксидазные конъюгаты для постановки иммуноферментного анализа и иммуногистохимического метода были любезно предоставлены ведущим научным сотрудником отдела вирусологии ВИЭВ Юровым Г.К.

Антиген для постановки РТГА был любезно предоставлен ведущим научным сотрудником отдела вирусологии ВИЭВ Ярных Е.В.

Необходимые для проведения работы растворы готовили из реактивов фирм «Biorad», «Sigma», «Promega» (США), «Pharmacia» (Швеция), «Fermentas» (Литва), а также отечественного производства фирм «Хеликон», «Биотот», «Литех» квалификации о с ч

Культивирование вируса в культуре клеток

Культуры клеток выращивали в среде Игла MEM с добавлением 2мМ глутамина, 5% сыворотки крови КРС для культур клеток, пенициллина по 100 ЕД/мл и стрептомицина по 100 мкг/мл. Штаммы вируса «ПП1», «RhinoTune» пассировали, используя

диплоидную клеточную культуру почки кролика (RK-13) Штамм «СВ/69» культивировали в перевиваемой клеточной культуре почки телёнка (ПТП) Титр вируса по инфекционному действию на культуру клеток оценивали по методу Рида и Менча

Культивирование вируса в организме лабораторных животных

Для культивирования вируса использовали мышей (самки, самцы) линии BALB/c массой 3 – 25 г Мыши были разделены на равноценные группы, по 10 мышей в группе Мышам опытных групп вирус (штамм «ПП1») с инфекционным титром 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 6,0 Ig ТЦД₅₀/мл и 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл инокулировали интрацеребрально, интраназально или подкожно Мышам контрольных групп вводили культуральную жидкость незаражённой культуры клеток аналогичным способом В течение 10 дней после заражения ежедневно проводили клинический осмотр мышей контрольных и опытных групп и фиксировали изменение их веса Мышей с симптомами заболевания подвергали эвтаназии, вскрывали и асептично отбирали головной мозг, лёгкие, печень, селезёнку, почки, сердце, матку для вирусологических исследований Из каждой пробы готовили 30 % суспензию на среде Игла MEM с добавлением пенициллина по 100 ЕД/мл и стрептомицина по 100 мкг/мл Наличие вируса в полученной суспензии проверяли в культуре клеток RK-13 по развитию характерного цитопатического действия Для заражения культуры клеток полученную суспензию центрифугировали при 2000g 20 мин и полученный супернатант использовали для заражения Титр вируса по инфекционному действию на животных оценивали по методу Рида и Менча

Иммунизация лабораторных животных

Использовали самок мышей линии BALB/c весом 8 – 10 г Для иммунизации были использованы иммуногенные препараты различной концентрации вакцинный штамм «СВ/69», вакцинный штамм «Rhinomune», инактивированный 0,5% раствором формалина ВГЛ-1 (штамм «ПП1»), рекомбинантная плазмида, содержащая в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1 Мыши были разделены на группы в соответствии с составом препарата, по 10 мышей в группе Иммуногенные препараты вводили подкожно Повторную иммунизацию проводили через 14 дней после первичной Кровь забирали из хвостовой вены через 14 дней после первичной иммунизации и через 7, 14, 21, 35, 49, 64 и 80 дней после повторной Сыворотки животных одной группы объединяли и определяли уровень антигел в ИФА, РН и РТГА Контрольную сыворотку получали от неиммунизированных животных

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Идентификацию ДНК вируса в головном мозге мышей, заражённых эпизоотическим штаммом «ПП1» ВГЛ-1, проводили методом ПЦР Образцы для постановки ПЦР

обрабатывали по протоколам и с использованием коммерческих наборов фирмы «Литех» Полученные суспензии диагностировали в ПЦР, используя праймеры (5' – CTTGTGAGATCTAACCGCAC, 3' - GGGTATAGAGCTTTCATGGG), специфичные нуклеотидной последовательности фрагмента гена гликопротеина В вируса ППЛ по методу, предложенному Kigisawa et al (1993) Параметры ПЦР рассчитывали с помощью компьютерной программы “Vector NTI” и модифицировали экспериментально Праймеры синтезированы ЗАО «Синтол», Россия Реакции проводились с использованием реактивов и ферментов фирм «Fermentas» (Литва), «Promega» (Швеция) и «Литех» (Россия) Учёт результатов реакции проводили на трансиллюминаторе при длине волны 312 нм

Гистологический метод

Гистологические препараты были приготовлены из головного мозга мышей на 5 сутки после интрацеребральной инокуляции вирулентного для мышей штамма ВГЛ-1, полученного нами методом селекции, а также головного мозга мышей из контрольных групп Изучение морфологии органов у мышей проводили с применением окраски фиксированных срезов гематоксилин – эозином и пикрофуксином по Ван - Гизону Органы фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезжиривали в спиртах, заливали в парафиновые блоки, из которых готовили срезы толщиной 5—7 микрон и окрашивали гематоксилин – эозином или пикрофуксином по Ван - Гизону по общепринятой методике

Иммуногистохимический метод

Изучение локализации антигена в головном мозге инфицированных мышей проводили с использованием иммуногистохимического метода (непрямой вариант) В качестве отрицательного контроля использовали ткани мозга контрольных мышей Дополнительным контролем служили гистологические препараты, обработанные нормальной сывороткой лошади

Гистологические срезы готовили из парафиновых блоков по обычной методике Удаляли парафин со срезов в трёх сменах ксилола, по 2 мин в каждой смене и трёх сменах этилового спирта в концентрации 96%, 96% и 70% соответственно, по 2 мин в каждой смене Промывали срезы дистиллированной водой и добавляли 50 мкл 0,3 % раствора перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы Затем срезы прогревали в дистиллированной воде при 37°C в течение 5 – 10 мин и помещали в 0,1 % раствор проназы Е в объёме 200 мкл на 1 – 2 мин с целью демаскирования антигена Ферментативную обработку останавливали, опустив стекла со срезами в дистиллированную воду, а затем в фосфатно – солевой буфер (ФСБ) (0,02М фосфатного буфера, 170мМ NaCl) В качестве блокирующего раствора использовали БСА в концентрации 0,2% в объёме 200 мкл Промывали срезы ФСБ 3 – 4 раза На следующем этапе для иммуномечения использовали

моноспецифическую поливалентную сыворотку лошади против ВГЛ-1 с титром антител в ИФА 1 : 6400. На срезы наносили рабочее разведение антител и инкубировали во влажной камере 30 мин при $t = 37^{\circ}\text{C}$. По окончании инкубации промывали ФСБ 3 – 4 раза. На следующем этапе на срезы наносили иммунопероксидазный конъюгат. В качестве конъюгата использовали аффинно очищенные антитела против иммуноглобулинов лошадей, полученные на кролике, конъюгированные с пероксидазой хрена. Инкубацию проводили в условиях, аналогичных инкубации с сывороткой. Срезы промывали ФСБ 3 – 4 раза и добавляли субстратную смесь. В качестве субстратной смеси использовали коммерческий препарат Opti-4 CN™ Substrat Kit фирмы «Bio - Rad» (США) на основе хромогена 4 - хлоро - 1 нафталя. Окраску субстратной смесью проводили по протоколу фирмы - изготовителя. Учёт реакции проводили под микроскопом при $\times 200$ и $\times 400$.

Серологические исследования

Для проведения серологических исследований использовали иммуноферментный анализ, реакцию нейтрализации и реакцию торможения гемагглютинации.

Иммуноферментный анализ

Для проведения экспериментальных исследований был использован непрямой вариант твердофазного ИФА для выявления антител к вирусу герпеса лошадей 1 типа. При постановке ИФА антиген (вирионы ВГЛ-1, очищенные ультрацентрифугированием в 30 – 65 % градиенте сахарозы) адсорбировали на иммунологические планшеты (производства фирмы «Greiner – bio», Германия) по 100 мкл в лунку в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,4. После адсорбции лунки планшет промывали 4 – 5 раз промывочным раствором. Для промывочного раствора использовали ФСБ с добавлением Твина - 20 (0,01М фосфатного буфера pH 7,4, 170мМ NaCl, 0,05 % Твина – 20). Готовили ряд последовательных двукратных разведений сывороток в ФСБ с добавлением Твина - 20 (0,02 М фосфатном буфере pH 7,4, 170 мМ NaCl, 0,05% Твина – 20). Реакцию проводили в объёме 100 мкл. Инкубировали с исследуемыми сыворотками 1,5 часа при $t = +37^{\circ}\text{C}$. Лунки планшет 3 – 4 раза промывали промывочным раствором и добавляли иммунопероксидазный конъюгат. В качестве конъюгата использовали аффинно очищенные антитела против иммуноглобулинов мышей, полученные на кролике, конъюгированные с пероксидазой хрена. Инкубацию с конъюгатом проводили в условиях аналогичных инкубации с сыворотками. По окончании инкубации лунки планшет промывали 4 – 5 раз промывочным раствором и проявляли реакцию внесением в каждую лунку субстратной смеси. В качестве субстратной смеси использовали коммерческий препарат «ТМБ» на основе хромогена 3, 3',5,5' – тетраметилбензидина (производства фирмы «Бюлаб», Россия). Окраску субстратной смесью проводили по протоколу фирмы - изготовителя. Результаты ИФА оценивали на фотометре.

«Multiscan®MCC/340» с вертикальным лучом при длине волны 450 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП, 450) Положительными считали пробы, коэффициент оптического поглощения которых, начиная с разведения 1 : 400 в 2 и более раз превосходил коэффициент оптического поглощения отрицательного контроля, но при этом был не ниже 0,200 оптических единиц (о.е.) Уровень оптической плотности ниже 0,150 о.е. принимали за отрицательный результат

Реакция нейтрализации

Нейтрализующую активность сывороток крови мышей определяли в реакции нейтрализации Сыворотку подвергали тепловой обработке при 56°C в течение 30 мин для инактивации белков системы комплемента РН проводили микрометодом с двукратными разведениями сывороток и постоянной дозой вируса (100TCD₅₀/мл) В лунки культуральных планшетов ("Costar", США) вносили 0,03 мл сыворотки в двукратном разведении и равный объём вируса, инкубировали 1 час до внесения суспензии клеток RK – 13 (1 млн клеток/ мл в среде Игла MEM с добавлением 5% эмбриональной сыворотки КРС), учёт результатов реакции проводили на 3 сутки За титр антител исследуемой сыворотки принимали наибольшее её разведение, которое сдерживало развитие ЦПД вируса

Реакция торможения гемагглютинации

Антигемагглютинины в сыворотках крови мышей выявляли в реакции торможения гемагглютинации по методу, предложенному К. П. Юровым, В. К. Сологуб (1979) Для предотвращения неспецифической гемагглютинации сыворотки мышей предварительно инкубировали с эритроцитами лошадей

Статистическая обработка полученных результатов

Статистический анализ выполнялся с помощью пакета программ Microsoft Office XP Professional, Statistica 5.0, "Statsoft Inc" для Windows

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Изучение гуморального иммунного ответа в динамике у мышей в зависимости от природы иммуногена

Проводили сравнительный анализ динамики формирования гуморального иммунного ответа на инактивированный вирус, аттенуированный живой вирус и рекомбинантную плазмиду pYT1, содержащую в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1, разработанную совместно (Ткачёв И. Ю. и др., 2003) сотрудниками лаборатории эпизоотологии, диагностики и профилактики респираторных вирусных болезней крупного рогатого скота и лошадей отдела вирусологии ВИЭВ и лаборатории молекулярной биологии и генной инженерии микроорганизмов ВНИИСХБ В последнем случае инокуляция

животным генно – инженерной конструкции должна была обеспечить иммунный ответ исключительно на один из поверхностных гликопротеинов (gp D) ВГЛ-1

В качестве препаратов для иммунизации использовали вакцинные штаммы «СВ/69» и «RhinoImune», инактивированный ВГЛ-1 (штамм «ПП1») и рекомбинантную конструкцию pIYT 1 Результаты эксперимента представлены на рис 1

Антигенную активность указанных препаратов оценивали на 7, 21, 35, 49, 64 и 80 сутки после двукратной иммунизации мышей с интервалом 14 дней В работе были использованы самки мышей линии BALB/c в возрасте 20 – 25 дней Титр антител в сыворотках определяли в ИФА Отрицательным контролем служили сыворотки неиммунизированных животных

Период логарифмического нарастания титров антител наблюдали у мышей всех групп на 7 - 21 сутки после второй иммунизации Наиболее высокие титры антител вызывал вакцинный штамм «СВ/69» Рекомбинантная конструкция pIYT 1 обеспечивала формирование менее напряжённого иммунного ответа в сравнении с цельновирионными препаратами, но значительно более стабильного и продолжительного Стабильный уровень антител в крови наблюдали на 21 - 64 сутки после второй иммунизации Снижение титра антител при этом отмечали на 64 - 80 сутки, после введения других препаратов снижение титра антител происходило значительно раньше на 35 сутки для вакцинных штаммов, на 49 сутки для инактивированного вируса Сравнение двух вакцинных штаммов выявило относительно низкую иммуногенность вакцинного штамма «RhinoImune» в сравнении с «СВ/69» Это в определённой степени коррелирует с результатами исследований, проведёнными на лошадях Neely et al (1978), указавшими не только на недостаточную иммуногенность вакцины «RhinoImune», но и на её остаточную вирулентность В настоящее время вакцина «RhinoImune» рекомендуется только для профилактики респираторной формы ВГЛ-1 инфекции, но не рекомендуется для профилактики абортов и миеломенингоцелепатии (Allen, 2002)

3.2 Эффективность комбинированного введения вакцинных препаратов при использовании различных схем иммунизации

Известно, что предшествующий иммунитет может существенно влиять на

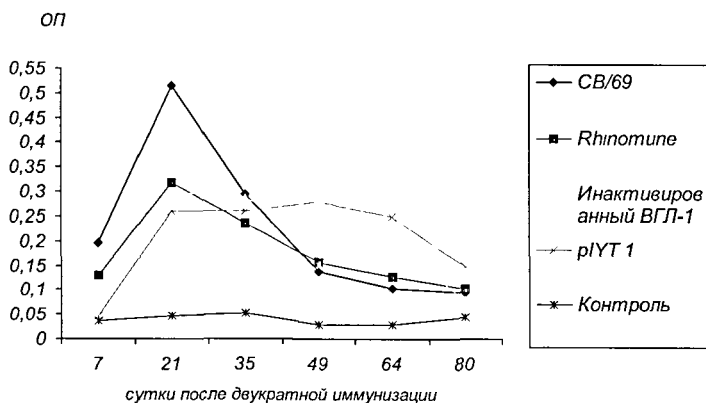


Рис 1 Уровень антител у мышей на 7, 21, 35, 49, 64, 80 сутки после двукратной иммунизации в ИФА (разведение сывороток 1 : 400)

По осям абсцисс – сутки после двукратной иммунизации, по осям ординат а) оптическая плотность (ОП) (разведение сывороток 1 : 400)

Препараты для иммунизации

- вакцинный штамм «CB/69» по 0,2 x 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл
- вакцинный штамм «Rhinomune» по 0,2 x 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл
- инактивированный 0,5% раствором формалина ВГЛ-1 (штамм «ГП1») по 0,2 x 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл
- рекомбинантная конструкция pIYT 1 (1мкг/мкл) по 0,1 мл

интенсивность ответа на иммунизацию животного гомологичными антигенами. Указанное обстоятельство имеет немаловажное практическое значение, поскольку большой процент естественно восприимчивых животных - лошадей имеют антитела к ВГЛ-1

В связи с этим мы изучали иммунный ответ у модельных животных - мышей на комбинированное введение инактивированного ВГЛ-1 и рекомбинантной плазмиды pIYT 1, используя различные схемы иммунизации. Результаты эксперимента представлены на рис 2

Антигенную активность указанных препаратов оценивали после двукратной иммунизации мышей с интервалом 14 дней. В работе были использованы самки мышей линии BALB/c в возрасте 14 дней. Титр антител в сыворотках определяли в ИФА, РН и РТГА. Отрицательным контролем служили сыворотки неиммунизированных животных. На рис 2 показан уровень специфических антител в сыворотке крови мышей при исследовании их в ИФА, РН и РТГА на 7 неделе после повторной иммунизации. Из

данных, приведенных на рисунке 2а видно, что титр антител в ИФА у мышей 2-ой группы, последовательно иммунизированных рИУТ 1 и инактивированным ВГЛ-1 выше, чем у мышей остальных групп. Двукратное введение рекомбинантной конструкции также вызывало у мышей выраженный иммунный ответ, превышающий уровень положительного контроля. У мышей 5-ой группы, иммунизированных пДНК, не содержащей смысловой ген, а также у мышей 7-ой – контрольной группы специфический иммунный ответ не обнаруживали. Результаты исследования этих же проб в РН и РГА коррелировали с данными ИФА. В то же время данные РГА показали большую эффективность иммунного ответа на последовательное введение рекомбинантной плазмиды и инактивированного ВГЛ – 1. При этом титр антител к гемагглютинирующему вирусу повышался в 1, 7 раза в сравнении с титром антител, выявляемых у мышей положительной группы, двукратно иммунизированных инактивированным ВГЛ - 1 ($5,0 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{мл}$). На двукратное введение рекомбинантной плазмиды получали пониженный ответ к гемагглютинирующему антигену ВГЛ - 1. Самый низкий уровень антител был обнаружен у мышей 4 группы двукратно иммунизированных инактивированным ВГЛ-1 ($4,0 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{мл}$). Уровень вируснейтрализующих антител был выше у 1 группы мышей, иммунизированных двукратно рИУТ 1 по сравнению с остальными группами. Самый низкий уровень антител находили у мышей 3 группы последовательно иммунизированных инактивированным ВГЛ - 1 и рИУТ 1 (Рис 2б).

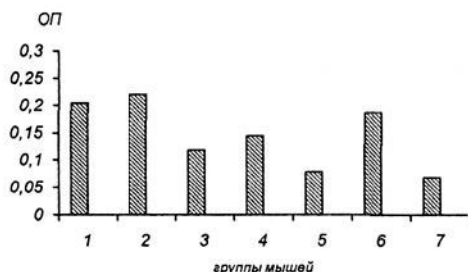
Таким образом, у мышей, предварительно иммунизированных инактивированным вирусом был зафиксирован низкий уровень антител после введения рекомбинантной плазмиды. Напротив, повышение уровня специфических антител было отмечено у мышей иммунизированных инактивированным ВГЛ - 1 на фоне специфического иммунного ответа, ранее сформированного рекомбинантной плазмидой.

3. Изучение нейротропных свойств ВГЛ-1

Для решения поставленных задач было необходимо воспроизвести у мышей инфекционный процесс, характерный для естественно – восприимчивых животных, и провести селекцию вирулентного штамма ВГЛ-1 для последующей работы по изучению напряженности вакцинального иммунитета. Для моделирования инфекции был выбран эпизоотический штамм «ПП1» ВГЛ-1, изолированный от лошадей в 2000 г в период вспышки абортуса и поражения ЦНС в виде пареза задних конечностей.

Мышей линии BALB/c различного возраста, используемых в качестве лабораторной модели, заражали интрацеребрально по 20 мкл культуральной среды, содержащей ВГЛ-1 (штамм «ПП1») в титре $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50} / \text{мл}$. В качестве отрицательного контроля

а) ИФА (разведение сывороток 1 : 1600).



б) РН и РТГА

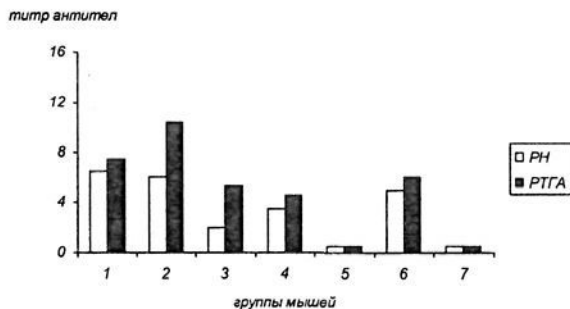


Рис. 2 Иммунный ответ у мышей на комбинированное введение различных препаратов а) ИФА (разведение сывороток 1 : 1600); б) РН и РТГА

По осям абсцисс – группы мышей; по осям ординат: а) оптическая плотность (ОП, усл. ед.), б) титр антител, а) ИФА (разведение сывороток 1 : 1600); б) – РН и РТГА. Группы мышей: 1) Мыши иммунизированы двукратно рИУТ.1(1мкг/мкл) по 0,1 мл; 2) 1 иммунизация мышей рИУТ.1(1мкг/мкл) по 0,1 мл; 2 иммунизация – инактивированным ВГЛ -1 по 0,2 x 4,0 lg ТЦД₅₀ /мл; 3) 1 иммунизация мышей инактивированным ВГЛ -1 по 0,2 x 4,0 lg ТЦД₅₀ /мл; 2 иммунизация – рИУТ.1(1мкг/мкл) по 0,1 мл; 4) Мыши иммунизированы двукратно инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 4,0 lg ТЦД₅₀ /мл; 5) Мыши иммунизированы двукратно рИУТ, не содержащей смысловый ген (1мкг/мкл) по 0,1 мл; 6) Положительный контроль. Двукратная иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 5,0 lg ТЦД₅₀ /мл; 7) Отрицательный контроль. Введение физиологического раствора по 0,2 мл.

использовали мышей, которым инокулировали интрацеребрально по 20 мкл культуральной среды

В результате проведенных исследований была установлена нейропатогенность эпизоотического штамма «ПП1» ВГЛ-1 для мышей в возрасте от 1 до 8 дней. Инкубационный период экспериментальной инфекции составил 24 – 48 часов. Клинические признаки характеризовались снижением веса, отставанием в росте, повышенной нервной возбудимостью на внешние раздражители, нарушением координации движения на 4 – 5 сутки после заражения и летальным исходом на 5 – 6 сутки после заражения. У контрольных животных не наблюдали признаков заболевания. В течение 6 суток происходило отставание в росте зараженных мышей. В культуре клеток RK-13 из тканей мозга мышей опытной группы с симптомами заболевания на 6 сутки \pm изолировали вирус с инфекционным титром $4,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл, в других органах вирус обнаружить не удалось. Результаты реиноляции вируса в культуре клеток RK-13 совпадали с данными ПЦР. Интересно отметить, что культивирование штамма «ПП1» в организме мышей и его реиноляция в культуре клеток RK-13 сопровождалась изменением характерного цитопатического действия, вызванного в культуре клеток исходным вирусом. Исходный штамм «ПП1» ВГЛ-1 вызывал цитопатические изменения в виде гроздевидного скопления округлых клеток. Цитопатические изменения, вызванные реинолированным от мышей вирусом, отличались появлением в цитоплазме клеток RK-13 многочисленных вакуолей разного диаметра и крупных симпластов. Специфичность реинолированного вируса была подтверждена в реакции нейтрализации с использованием поликлональной сыворотки лошади моноспецифической к ВГЛ-1. Индекс нейтрализации $4,0 \lg$ свидетельствовал о принадлежности реинолированного вируса к ВГЛ-1. При заражении мышей старше 8 дней процент заболеваемости снижался пропорционально возрасту животных. Мыши старше 15 дней после интрацеребральной инокуляции штамма «ПП1» ВГЛ-1 не заболевали.

3.4 Селекция штамма нейропатогенного для взрослых мышей

Для повышения вирулентности штамма «ПП1» ВГЛ-1 для мышей старшего возраста провели последовательные пассажы вируса. Для этого вирус из мозга мыши 4-дневного возраста с инфекционным титром $4,5 \lg$ ТЦД₅₀/мл инокулировали и/ц по 20 мкл группе мышей различного возраста от 1 до 10 дней. В течение 10 дней наблюдения у животных признаков заболевания не наблюдали. Часть животных на 5 сутки после заражения использовали для вирусологических исследований. Реинолировать вирус из различных органов мышей в культуре клеток RK-13 не удалось. Таким образом, прямые пассажы не

приводили к повышению вирулентности штамма «ПП1» ВГЛ-1 для мышей старшего возраста

После проведения серии перемежающихся пассажей на мышах в возрасте от 4 до 40 дней и культуре клеток линии RK-13 был получен нейротропный штамм, обозначенный «ПП1/1», адаптированный к росту в организме мышей в возрасте до 40 дней, вызывающий заболеваемость животных после интрацеребральной или интраназальной инокуляции. Всего провели 11 пассажей на мышах и 22 пассажа в культуре клеток RK-13. Адаптацию вируса проводили по следующей схеме: мышей в возрасте 4 суток заражали интрацеребрально по 20 мкл вирусосодержащей культуральной среды. Титр вируса при этом составил $7,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ (100 ЛД_{50}). В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым инокулировали и/ц по 20 мкл культуральной среды. В течение 7 дней после заражения проводили наблюдение за мышами контрольных и опытных групп. На 5 – 6 сутки после заражения часть мышей опытной группы с симптомами заболевания использовали для вирусологических исследований. Для использования в следующем пассаже определяли титр вируса из тканей мозга мышей с наиболее тяжёлой формой заболевания. После каждого пассажа на мышах проводили по 2 пассажа на культуре клеток RK-13 до восстановления инфекционного титра $7,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$. Рензолированным в RK-13 вирусом заражали мышей более старших возрастных групп в следующем пассаже. Наиболее сложным периодом адаптационного процесса было преодоление возрастного барьера 15 дней, количество заболевших животных при этом составило всего 5 %. После 20 пассажа количество заболевших животных было постоянным и составляло 100 %.

В процессе адаптации вируса у мышей на 3 – 6 сутки после интрацеребрального заражения наблюдали специфические неврологические расстройства. На 3 – 4 сутки после заражения наблюдали снижение веса на 15 – 20 % от веса контрольных животных, повышенную нервную возбудимость на внешние раздражители, динамическую атаксию. На 4 – 5 сутки появлялись клонические судороги в форме гиперкинезов. Гиперкинезы проявлялись в виде ложных жевательных или плавательных движений, подёргивания век и отдельных мышц головы, через несколько часов отмечали тонические судороги мышц плеча, контрактуру затылка. На 5 – 6 сутки после заражения при полном сохранении волевого импульса у животных отмечали крайнюю ограниченность движений. Вследствие усиления статического тонуса и затруднённого перехода его в динамический, инициатива к движению у мышей резко понижалась. С прогрессированием болезни движения становились более ограниченными и медленными, в конечном итоге мыши «застывали» в одной позе, и не реагировали на внешние раздражения. На 6 – 7 сутки заболевание заканчивалось летальным исходом.

Для изучения особенностей биологических свойств полученный адаптированный штамм с инфекционным титром $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ инокулировали интраназально по 40 мкл группе мышей в возрасте от 28 до 40 дней. Было установлено, что адаптированный штамм вируса после интраназальной инокуляции вызывал у мышей характерные неврологические расстройства с последующим летальным исходом, однако, инкубационный период при интраназальном введении был более продолжительным и составлял 4 – 5 дней. Мышей, у которых наблюдали атаксию и клонические судороги на 6 -7 дни после интраназального заражения использовали для вирусологических исследований. В культуре клеток RK-13 из тканей мозга мышей опытной группы с симптомами заболевания изолировали вирус с инфекционным титром $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, в других органах вирус обнаружить не удалось. Специфичность реизолированного вируса была подтверждена в реакции нейтрализации.

Установленная нами возможность моделирования ВГЛ-1 инфекции при интраназальном заражении лабораторных животных имеет важное значение, поскольку у лошадей первичная репликация вируса происходит в верхних дыхательных путях, вирус проникает в эпителиальные клетки носовых ходов, становится клеточно-ассоциированным и гематогенным путём распространяется в места вторичной репликации, в частности головной мозг (Bryans, 1969, Scott et al, 1983).

3.5 Оценка возможности использования адаптированного штамма «ППП/1» для контроля иммуногенности вакцин против РПЛ методом контрольного заражения.

Проводили гистохимические исследования для изучения особенностей патогенеза экспериментальной инфекции у мышей. Результаты представлены на рис 3.

Срезы для гистохимических исследований готовили из тканей мозга мышей в возрасте 28 дней, подвергнутых эвтаназии на 5 сутки после интрацеребрального заражения адаптированным штаммом «ППП/1». В качестве отрицательного контроля использовали ткани мозга контрольных мышей. Для иммуногистохимических исследований дополнительным контролем служили гистологические препараты, обработанные нормальной сывороткой лошади.

Нейропатогенный адаптированный штамм «ППП/1» ВГЛ-1 вызывал у мышей энцефалит, характеризующийся развитием васкулита лимфоидного типа (рис 3). В гистосрезах выявлены инфильтрация мелких кровеносных сосудов и периваскулярных зон лимфоидными клетками, тромбозы сосудов и воспалительные процессы периваскулярных зон (рис 3а и 3б), а также скопления лимфоидных клеток под мягкой мозговой оболочкой (рис 3в). Иммуногистохимические исследования показали, что вирусный антиген локализован в области периваскулярных зон и под мозговой оболочкой (рис 3г).

Необходимо отметить, что у лошадей патогистологические изменения, общие для

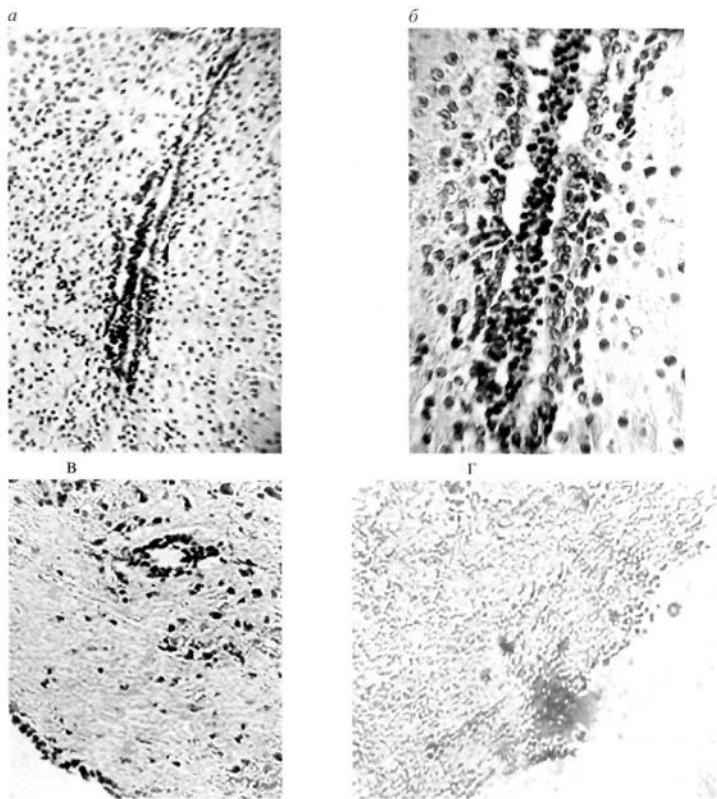


Рис. 3 Результаты гистологических исследований

а - Васкулит, инфильтрация лимфоидными клетками сосудов и периваскулярной зоны. Окраска по Ван – Гизону. ($\times 200$)

б - Васкулит, инфильтрация лимфоидными клетками сосудов и периваскулярной зоны. Окраска по Ван – Гизону. ($\times 400$)

в - Скопления лимфоидных клеток в области мозговой оболочки. Окраска гематоксилин – эозином. ($\times 200$)

г- Иммунохимическое окрашивание. Вирусный антиген локализован в области мозговой оболочки. ($\times 200$)

всех случаев герпесвирусной миелоэнцефалопатии независимо от тяжести клинического проявления, представляют собой васкулиты с последующей гипоксической дегенерацией и некрозом в прилегающей нервной ткани. Такие течения васкулитов характеризуются периваскулярными скоплениями мононуклеарных фагоцитов и нейтрофилов в области адвентициальной, медиальной и внутренней стенки сосуда, некрозом медиальной стенки сосуда, пролиферацией эндотелиальных клеток артериол и венул и, изредка, наличием тромбов в просвете сосуда (Edington et al, 1986).

Основные проявления инфекционного процесса, полученные нами в эксперименте на мышах, в большой степени отвечают показателям при естественном течении инфекционного процесса у лошадей. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить адекватность выбранной лабораторной модели и оценить возможность её использования для разработки теста по контролю иммуногенности вакцин.

3.6. Определение оптимальной заражающей дозы адаптированного штамма для мышей

Дозу оптимальную для заражения определяли титрованием адаптированного нейтропатогенного штамма, полученного после 33 пассажа.

Вирус инокулировали мышам линии BALB/c в возрасте 28 – 30 дней и 38 – 40 дней интрацеребрально по 20 мкл в титре 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 6,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 4,0 Ig ТЦД₅₀/мл и 3,0 Ig ТЦД₅₀/мл. В результате опытов установили, что минимальная летальная доза адаптированного штамма для мышей обеих возрастных групп составляет 0,02 x 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл. Заражение мышей вирусом с инфекционным титром 4,0 Ig ТЦД₅₀/мл приводило к развитию характерной клинической картины болезни с последующим выздоровлением, заражение мышей вирусом с инфекционным титром 3,0 Ig ТЦД₅₀/мл не вызывало признаков инфекции. Таким образом, установлено, что оптимальной дозой для заражения является 0,02 x 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл.

3.7. Лабораторное испытание иммуногенности вакцинного штамма «СВ/69»

Для оценки иммуногенности вакцинного штамма «СВ/69» методом контрольного заражения использовали полученный после 27 пассажа штамм, вирулентный для мышей в возрасте до 30 дней. Мышей в возрасте 14 дней однократно вакцинировали по 0,2 x 6,0 Ig ТЦД₅₀/мл и через 14 дней проводили интрацеребральное контрольное заражение адаптированным штаммом ВГЛ-1. В результате проведенных исследований было установлено, что вакцинация мышей предотвращала заболевание у 100% животных. Таким образом, показана принципиальная возможность защиты мышей, вакцинированных «СВ/69», от заболевания, на основании чего разработан метод лабораторного контроля иммуногенной активности вакцин против РПЛ.

3.8 Экспериментальная оценка иммуногенности вакцин при однократной и двукратной иммунизации мышей против РПЦ

Для иммунизации мышей линии BALB/c в возрасте 12 – 14 дней использовали вакцинные препараты различной концентрации вакцинный штамм «CB/69» в титре от 5,0 до 2,0 Ig ТЦД₅₀/мл, вакцинный штамм «Rhino-mune» в титре от 5,0 до 2,0 Ig ТЦД₅₀/мл, инактивированный ВГЛ-1 штамм «ПП1» в титре до инактивации от 7,0 до 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл, рекомбинантная плазмида pYU1, содержащая в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1 в дозе 50 и 100 мкг на животное

Иммуногенную активность указанных препаратов оценивали после однократной и двукратной иммунизации мышей с последующим контрольным заражением. Определение дозы оптимальной для иммунизации проводили по результатам наблюдения и взвешивания мышей контрольных и опытных групп. Результаты представлены на рис 5 и 6. Для двукратной иммунизации с интервалом 14 дней использовали следующие схемы: 1) двукратная иммунизация «CB/69» по 0, 2 x 2,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 2) двукратная иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0, 2 x 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл, 3) двукратная иммунизация рекомбинантной плазмидой pYU1 по 100 мкг, 4) 1 иммунизация pYU1 по 100 мкг, 2 иммунизация - «CB/69» по 0, 2 x 2,0 Ig ТЦД₅₀/мл.

Контрольное заражение адаптированным штаммом в дозе 0,02 x 5,0 Ig TCD₅₀/мл проводили интрацеребрально через 14 дней после однократной или двукратной иммунизации.

Эффективность иммунизации определяли по количеству мышей, устойчивых к летальности к заражению и по результатам иммунологических и вирусологических исследований. Титр антител определяли в ИФА и РН. Элиминацию вируса на 2 и 4 сутки после контрольного заражения у иммунизированных животных определяли титрованием реинфицированного вируса в культуре клеток RK-13.

Результаты опытов показали, что оптимальной иммунизирующей дозой для вакцинных штаммов «CB/69» и «Rhino-mune» является 0,2 x 4,0 Ig ТЦД₅₀/мл, для инактивированного ВГЛ-1 – 0, 2 x 7,0 Ig ТЦД₅₀/мл, для рекомбинантной плазмиды pYU1 – 100 мкг. Вакцинный штамм «CB/69» в дозе 0,2 x 4,0 Ig ТЦД₅₀/мл обеспечивал защиту от инфекции всех мышей в группе по заболеваемости. Остальные иммуногенные препараты при использовании оптимальной иммунизирующей дозы создавали частичную защиту от инфекции. Вакцинный штамм «Rhino-mune» в дозе 0,2 x 4,0 Ig ТЦД₅₀/мл и 0,2 x 5,0 Ig ТЦД₅₀/мл обладал для мышей реактогенными свойствами. Мыши, иммунизированные «Rhino-mune», отставали в росте и развитии по сравнению с контрольными животными. Степень проявления реактогенности зависела от количества антигена. Мыши, отстающие в

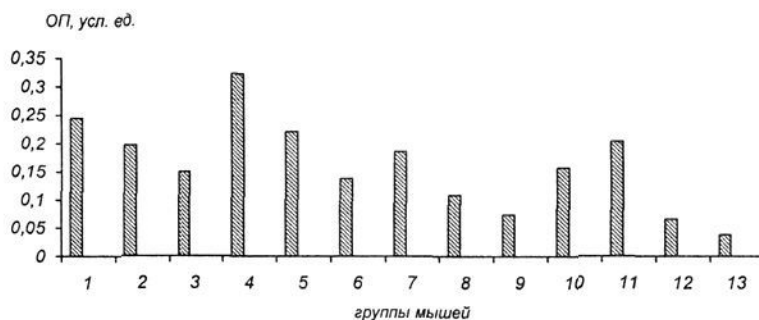
росте через 14 дней после иммунизации «RhinoImune», не были устойчивы к контрольному заражению нейрпатогенным штаммом ВГЛ-1 и переболевали, что выражалось незначительным угнетением и снижением веса с последующим выздоровлением. Инактивированный ВГЛ-1 и рекомбинантная плазмида pIYT 1 в максимальных дозах обладали наибольшей эффективностью.

При серологическом исследовании у иммунизированных мышей выявляли специфические антитела к ВГЛ-1. На рис. 4А показан уровень антител при исследовании их в ИФА. Из приведенных данных видно, что титр антител у мышей 1 группы, иммунизированных вакцинным штаммом «CB/69» в дозе $0,2 \times 4,0 \text{ Ig TЦД}_{50} / 1 \text{ мл}$ выше, чем у мышей остальных групп. У мышей 12 группы, иммунизированных плазмидой pIYT, не содержащей смысловой ген, а также у мышей 13 – контрольной группы специфический иммунный ответ не обнаруживали. Результаты иммуноферментного анализа были подтверждены в реакции нейтрализации.

На 3 – 5 сутки после контрольного заражения у мышей 12 группы после введения пДНК, не содержащей смысловой ген и 13 – положительной контрольной группы развивались специфические неврологические расстройства: снижение массы тела, повышенная нервная возбудимость на внешние раздражители, динамическая атаксия, гиперкинезы и тонические судороги. На 4 – 5 сутки наблюдали парезы, у некоторых животных параличи задних конечностей с последующим летальным исходом всех животных в группе. Эффективность вакцинации мышей на 5, 7 и 10 сутки после заражения показана на рис. 4Б. Устойчивость мышей различных групп к заражению ВГЛ-1 коррелировала у них с титром антител, выявленных в ИФА и РН. Из представленных данных видно, что иммунизация вакцинными штаммами ВГЛ-1 «CB/69» и «RhinoImune» в дозе $0,2 \times \text{TЦД}_{50} \text{ Ig TCD}_{50} / \text{мл}$ обеспечивает выраженный иммунный ответ и устойчивость по летальности к контрольному заражению всех мышей в этой группе. Во всех остальных опытных группах вакцинация создаёт частичную защиту от инфекции. Эффективность иммунизации на уровне 60 – 70% регистрировали у большинства мышей 2, 5, 7 и 11 групп в виде устойчивости к инфекции или заболевания в лёгкой форме с последующим быстрым восстановлением. У мышей 3, 6, 8 и 9 групп, для которых эффективность иммунизации составляет 20 – 30%, после заражения развивались неврологические симптомы адекватные по степени тяжести положительному контролю. У мышей 10 группы, иммунизированных pIYT 1 в дозе 50 мкг, наблюдали летальный исход всех животных после контрольного заражения на 7 сутки, однако, на 5 сутки эффективность иммунизации составляла 60 % в сравнении с положительной контрольной группой, в которой на 5 сутки все животные после заражения погибли.

Результаты двукратной иммунизации показали, что комбинированное введение

А) ИФА (разведение сыворотки 1 : 1600)



Б) Эффективность иммунизации в % по количеству живых мышей

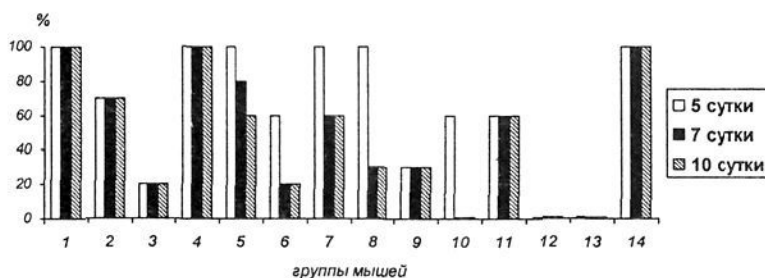


Рис 4 Оценка иммуногенности вакцин при однократном введении

По осям абсцисс – группы мышей; по осям ординат: а) оптическая плотность (ОП, усл. ед.) (разведение сыворотки 1 : 1600); б) эффективность иммунизации в % по количеству живых мышей.

Группы мышей: 1) иммунизация “СВ/69” по 0,2 x 4,0 lg ТЦД₅₀/мл; 2) иммунизация “СВ/69” по 0,2 x 3,0 lg TCD₅₀/мл; 3) иммунизация “СВ/69” по 0,2 x 2,0 lg ТЦД₅₀/мл; 4) иммунизация “Rhino-mune” по 0,2 x 4,0 lg ТЦД₅₀/мл; 5) иммунизация “Rhino-mune” по 0,2 x 3,0 lg ТЦД₅₀/мл; 6) иммунизация “Rhino-mune” по 0,2 x 2,0 lg ТЦД₅₀/мл; 7) иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 7,0 lg ТЦД₅₀/мл; 8) иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 6,0 lg ТЦД₅₀/мл; 9) иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 5,0 lg ТЦД₅₀/мл; 10) иммунизация рІУТ.1 по 50 мкг; 11) иммунизация рІУТ.1 по 100 мкг; 12) иммунизация пДНК, не содержащей «смысловой» ген по 100 мкг (контроль); 13) введение

физиологического раствора по 0,2 мл (положительный контроль), 14) введение физиологического раствора по 0,2 мл (отрицательный контроль) рекомбинантной конструкции рIYT 1 в дозе 100 мкг и вакцинного штамма «СВ/69» по 0,2 x 2,0 Ig ТЦД₅₀/мл оказалось лучшей стратегией вакцинации мышей, представленных в 4 группе (рис 6) Титр антител у мышей данной группы при исследовании их в ИФА в 1,6 раза выше, чем у мышей 1 группы, двукратно иммунизированных «СВ/69» и в 1,3 раза выше, чем у мышей 3 группы, двукратно иммунизированных рекомбинантной конструкцией рIYT 1 (рис 5А) Однако, полной связи между титрами вируснейтрализующими антител и невосприимчивостью к вирусу не обнаружено При заражении вирулентным вирусом 90% мышей 4 группы оставались резистентными к заболеванию (рис 5 Б) Результаты, полученные в этом опыте на контрольных животных соответствовали результатам однократной иммунизации

Результаты определения элиминации вируса на 2 и 4 сутки после контрольного заражения у иммунизированных животных показали, что при эффективности иммунизации 90 – 100% вирус уже на 2 сутки не обнаруживается, при эффективности иммунизации 60 – 70% вирус реизолировали в культуре клеток с инфекционным титром 2,5 Ig ТЦД₅₀/мл, на 4 сутки вирус не обнаруживали, при эффективности иммунизации 20 – 30% и у мышей положительной контрольной группы вирус реизолировали в культуре клеток с инфекционным титром 3,0 Ig ТЦД₅₀/мл на 2 и 4 сутки после заражения

3.9 Изучение влияния ВГЛ-1 на беременность

Изучали abortогенные свойства штамма «ПП1» ВГЛ-1 на лабораторных животных – мышах линии BALB/c, используемых в качестве экспериментальной модели

Мышей в возрасте 10 недель со сроком беременности 14 – 20 дней, заражали подкожно по 0,2 мл вирусосодержащей культуральной среды Титр вируса при этом составил 6,0 Ig ТЦД₅₀/мл В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым инокулировали подкожно по 0,2 мл культуральной среды В течение 14 дней после заражения за мышами проводили наблюдение В опытной группе у мышей, зараженных на более ранних сроках беременности (14 – 16 дней) наблюдали аборт в виде резорбции плодов, у мышей, зараженных на более поздних сроках беременности (17 – 20 дней), получали нежизнеспособный приплод В первую неделю жизни летальный исход наблюдали у 90 – 95% мышат Беременные самки после заражения клинических признаков инфекции не проявляли У мышей контрольной группы получали полноценный приплод

При повторном воспроизведении эксперимента на 3, 5 и 8 сутки после заражения по 3 беременные мыши из каждой группы использовали для вирусологических исследований В ПЦР на 3 сутки после заражения были идентифицированы фрагменты ДНК ВГЛ-1 в печени,

однако, в других пробах на 3 сутки, а также во всех пробах на 5 и 8 сутки после заражения вирус у мышей не обнаруживали. В культуре клеток RK-13 вирус изолировать не удалось.

ОП, усл. ед.

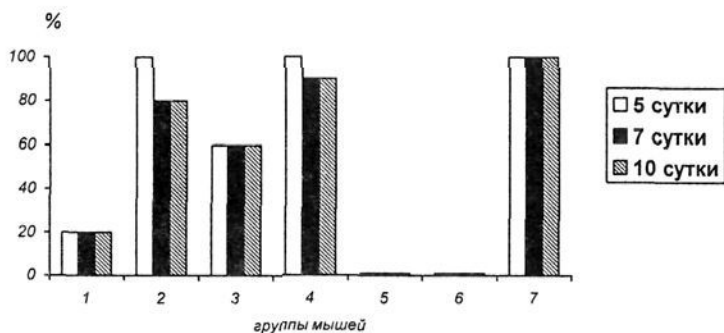
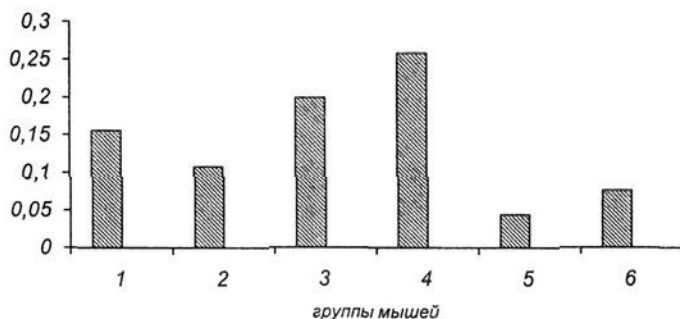


Рис.5 Оценка иммуногенности вакцин при двукратном введении

По осям абсцисс – группы мышей; по осям ординат – а) оптическая плотность (ОП, усл. ед.) ИФА (разведение сыворотки 1 : 1600; б) эффективность иммунизации в % по количеству живых мышей.

Группы мышей: 1) иммунизация «СВ/69» по 0,2 x 2,0 lg ТЦД₅₀/мл; 2) иммунизация инактивированным ВГЛ-1 по 0,2 x 7,0 lg ТЦД₅₀/мл; 3) иммунизация rIYT.1 по 100 мкг; 4) 1 иммунизация rIYT.1 по 100 мкг и через 14 дней 2 иммунизация «СВ/69» по 0,2 x 2,0 lg ТЦД₅₀/мл; 5) иммунизация rIYT, не содержащей «смысловый» ген по 100 мкг (контроль); 6) введение физиологического раствора по 0,2 мл (положительный контроль); 7) введение физиологического раствора по 0,2 мл (отрицательный контроль).

Таким образом, в матке присутствие вируса не было установлено на 3, 5 и 8 сутки после заражения. Рядом работ (Kukreja et al, 1998 и др.) было показано, что у заражённых беременных мышей вирусная инфекция плаценты и/или зародышей может отсутствовать, что зависит от биологических свойств некоторых штаммов ВГЛ-1. Предполагают, что аборт у мышей в таких случаях связан с нарушением функционирования кровеносных сосудов плаценты и является следствием непрямого действия вируса (Kukreja et al, 1998).

3.12 Оценка напряженности иммунитета на модели ВГЛ-1 аборта у мышей после введения различных вакцин

Для иммунизации мышей линии BALB/c (самок) в возрасте 20-22 дней использовали инактивированный ВГЛ-1 (штамм «ПП1») по 0,2 x 7,0 lg ТЦД₅₀/мл, рекомбинантную конструкцию рIYT 1 по 100 мкг и плазмиду prsCMV, не содержащую смысловой ген по 100 мкг.

Иммуногенную активность указанных препаратов оценивали после трёхкратной иммунизации мышей с интервалами 14 дней с последующим контрольным заражением. Через 2 месяца после первичной иммунизации во все группы к самкам были подсажены половозрелые самцы.

Контрольное заражение 1, 2 и 3 групп (самок) ВГЛ-1 (штамм «ПП1») проводили подкожно по 0,2 x 7,0 lg ТЦД₅₀/мл через 30 дней после третьей иммунизации. Мышей 4 группы использовали для отрицательного контроля. Эффективность иммунизации определяли по количеству живых мышат в каждой группе. Титр антител в сыворотке крови самок, полученной до заражения, исследовали в ИФА. Сохранность новорождённых мышей от самок, иммунизированных рекомбинантной конструкцией рIYT 1, инактивированным вирусом и для контроля плазмидой prsCMV, не содержащей «смысловой» ген, составила 14,71%, 32,35% и 2,94 % соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика лабораторной оценки антигенных и иммуногенных свойств различных препаратов вируса герпеса лошадей 1 (ВГЛ-1). Найдена лабораторная модель - мыши линии BALB/c для оценки антигенных свойств и напряженности иммунитета.

2. Охарактеризован иммунный ответ у мышей линии BALB/c на различные иммуногены ВГЛ-1: коммерческие вирусвакцины против ринопневмонии лошадей «CB/69» и «Rhino-mune», инактивированный вирус и рекомбинантную плазмиду рIYT 1, содержащую в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D (gD) ВГЛ-1.

3 Антитела, индуцированные у мышей рекомбинантной плазмидой p1YT 1, специфически распознают белок с молекулярной массой 80 кДа, соответствующий gD ВГЛ-1 и определяются в тестах вируснейтрализации, РТГА и ИФА в титрах, сопоставимых с реакцией на аттенуированный или инактивированный ВГЛ-1

4 Разработана лабораторная модель для изучения нервно-паралитической и abortогенной форм инфекции ВГЛ - 1 на мышах

5 Получен (методом перемежающихся пассажей) штамм вируса РПЛ «ПП1/1», адаптированный к мышам линии BALB/c, вызывающий у 6-ти недельных мышей при интрацеребральной или интраназальной инокуляции симптомы поражения центральной нервной системы, характерные для герпесвирусной миелозенцефалопатии лошадей. Эпизоотический штамм «ПП1» ВГЛ-1 вызывает у беременных мышей гибель эмбрионов после подкожной инокуляции

6 Вакцинный штамм «СВ/69», в оптимальной иммунизирующей дозе, обеспечивает полную защиту мышей от экспериментальной инфекции вирулентным штаммом ВГЛ -1. Вакцинный штамм «RhinoTune», инактивированный вирус (штамм «ПП1»), рекомбинантная конструкция p1YT 1 создают частичную защиту от инфекции

7 Комбинированное введение рекомбинантной конструкции p1YT 1 и цельновирионных вакцинных препаратов (инактивированного или аттенуированного ВГЛ-1) повышает гуморальный иммунитет у мышей и устойчивость их к контрольному заражению

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработаны (в соавторстве) «Рекомендации по получению рекомбинантной плазмиды, содержащей гены гликопротеинов вируса ринопневмонии лошадей, и их применению с использованием оптимальных доз для иммунизации восприимчивых лабораторных животных», утверждённые директором ВИЭВ в 2007 г

Разработана (в соавторстве) «Временная инструкция по ретроспективной диагностике ринопневмонии лошадей (выявление специфических антител) иммуноферментным анализом (ИФА)», утверждённая директором ВИЭВ в 2007 г

Материалы диссертации использованы в дополнении, подготовленном Референтной лабораторией МЭБ по ринопневмонии лошадей (эксперт К П Юров) для нового издания «Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines», раздел Equine diseases in list B, глава Equine rhinopneumonitis, Office International des Epizooties

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Алексеенкова С В Лабораторная модель для изучения иммуногенных свойств вакцинных препаратов против ринопневмонии лошадей /Алексеенкова С В, Ткачев И Ю, Юров Г К // Вет Патология – 2003 – 1 (5) 120 – 121
- 2) Алексеенкова С В Получение генетических конструкций, несущих полные гены поверхностных гликопротеинов вируса герпеса лошадей 1 для создания ДНК-вакцины / Ткачев И Ю, Юров Г К, Шмаров М М, Народницкий Б С, Алексеенкова С В, Юров К П // Материалы 2-ого Московского международного Конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ» Секция 2 – Биотехнология и сельское хозяйство – 2003 – С 233
- 3) Алексеенкова С В Эффективность комбинированного введения рекомбинантной плазмиды, содержащей в своём составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1 и инактивированный ВГЛ-1 /Алексеенкова С В, Ткачев И Ю, Юров Г К, Юров К П // Материалы 2-ого Московского международного Конгресса «БИОТЕХНОЛОГИЯ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ» Секция 2 – Биотехнология и сельское хозяйство – 2003 – С 247 - 248
- 4) Алексеенкова С В Иммунный ответ лабораторных животных на рекомбинантную плазмиду, содержащую в своем составе ген, кодирующий гликопротеин D герпесвируса лошадей 1 (ВГЛ-1) и инактивированный ВГЛ-1 / Алексеенкова С В, Ткачев И Ю, Юров Г К, Юров К П // Иммунология – 2005 – 26 (6) 351 – 353
- 5) Алексеенкова С В Нейропатогенность полевых штаммов герпесвируса лошадей 1 типа для белых мышей /Татаурова А В, Юров К П, Алексеенкова С В //Материалы Международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» Казань – 2005 – 2 329 – 330
- 6) Алексеенкова С В Нейропатогенные штаммы возбудителя ринопневмонии – вирусного аборта лошадей /Татаурова А В, Юров К П, Алексеенкова С В // Ветеринария – 2006 – 3 20 – 23
- 7) Алексеенкова С В Эффективность иммунизации мышей линии BALB/c при интрацеребральном заражении ВГЛ1 /Алексеенкова С В, Юров Г К, Ткачев И Ю, Юров К П // Иммунология – 2006 – 27(6) 361 – 363

Подписано в печать 09.04.07. Формат 60×84 1/16
Печать лазерная. Объем 1,75 у.п.л. Заказ 2/67. Тираж 100.