

На правах рукописи

БОРЗЕНКО ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ
ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА У СОБАК В
ПРОЦЕССЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНОГЕНЕЗА**

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

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**



Москва – 2005 г.

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко
(ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко)

Научный руководитель:

доктор биологических наук
ВЕРХОВСКИЙ ОЛЕГ АНАТОЛЬЕВИЧ

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор
ветеринарных наук, профессор
УЛАСОВ ВАЛЕНТИН ИЛЬИЧ

кандидат биологических наук
МНИКОВА ЛИДИЯ АЛЕКСЕЕВНА

Ведущее учреждение:

Всероссийский научно-исследовательский и
технологический институт биологической
промышленности (ВНИТИБП)

Защита диссертации состоится 14 сентября 2005 года в 14 часов на
заседании диссертационного совета Д.006.033.01 при ГНУ Всероссийский
научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им.
Я.Р.Коваленко по адресу:
109428, г. Москва, Рязанский проспект, 24/1, ВИЭВ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко

Автореферат разослан « 27 » сентя 2005 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук,
профессор



Н.П.Овдиенко

2007-4

2411848

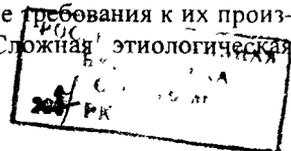
8057

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В разработке методов диагностики и средств специфической профилактики болезней животных основополагающая роль принадлежит иммунологии – науке, изучающей механизмы формирования иммунного ответа, иммунологической памяти и межклеточной кооперации лимфоцитов и базирующейся на современных представлениях об эффекторных механизмах иммунитета, среди которых главное место занимает взаимодействие антиген-антитело (J.E. Barlough and N.C. Pedersen, 1995; L.J. Gershwin et al, 1995; N.T. Gorman, 1995; Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский, 1998, 2000 и др.). При этом важную роль в оценке иммунологического состояния организма на различных этапах онто- и иммуногенеза, обусловленного процессами, возникающими в организме животных в ответ на иммуногены различной этиологии, играет анализ гуморальных факторов иммунного ответа.

Несмотря на то, что к настоящему времени опубликован ряд работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных изучению иммунного статуса собак в норме и при патологии (О.А. Верховский с соавт. 1996, 1998; А.А. Лисицина, 1997; М.В. Даниловский, 2000; А.Д. Середина с соавт., 2000; М.В. Мезенцева с соавт., 2001; И.В. Чуваев, 2001; Т.Р. Phillips et al., 1989; Т. Miyamoto et al., 1995; G. Mazza et al., 1994; P.B. Hill et al., 1995; A. Tipold et al., 2001; C. Leandro et al., 2001; A. Strasser et al., 1998, 2000, 2003; D.E. Mouzin et al., 2004 и др.) остаются неосвещенными многие вопросы, связанные с изучением структуры и функциональных свойств иммуноглобулинов собак, изменением уровня иммуноглобулинов и изотип-специфических антител в процессе постинфекционного и поствакцинального иммуногенеза. Кроме того, отсутствие отечественных тест-систем, предназначенных для оценки характера иммунного ответа и иммунологического статуса собак, сдерживает научные исследования, направленные на разработку и эффективное применение средств иммунокоррекции и иммунопрофилактики.

В настоящее время это особенно актуально, поскольку насчитывается большое количество иммунобиологических препаратов, находящихся в производстве и используемых практической ветеринарной службой России. К ним относятся, прежде всего, отечественные и зарубежные вакцины против основных вирусных болезней собак, включающих чуму, парвовирусный энтерит, инфекционный гепатит и аденовироз. Эти болезни занимают ведущее место в структуре инфекционной патологии собак, представляют наибольшую опасность и часто заканчиваются гибелью животных или оставляют в их организме длительные, а иногда и необратимые повреждения органов и тканей (В.И. Уласов, Л.В. Кириллов, 1999). В большинстве стран мира вакцинапрофилактика является важнейшим звеном в системе мер борьбы и самым эффективным методом эпизоотического контроля за этими болезнями. Повсеместное применение вакцин накладывает жесткие требования к их производству и методам биологического контроля. Сложная этиологическая



структура инфекционных болезней собак, широкое их распространение и необходимость вакцинации животных одновременно против нескольких наиболее распространенных болезней, обуславливают разработку и применение эффективных поливалентных вакцин, обеспечивающих формирование напряженного иммунитета (D.H.Davies, S.Pidford, 1991; J.A.Roth, 1991; R.D. Schultz, 1998; L.E.Carmichael, 1999 и др.). При этом необходимо решить сложные задачи по конструированию таких препаратов из антигенов различной природы, учитывая возможность их интерференции в организме животных в процессе иммуногенеза. Кроме того, создание поливалентных вакцин требует наличия методов контроля антигенных и иммуногенных свойств каждого компонента вакцины с использованием чувствительных и специфичных тест-систем.

В этой связи анализ гуморального иммунного ответа на основе оценки изотип-специфического распределения антител и количественного определения уровня иммуноглобулинов позволяет изучить динамику появления, нарастания и длительности сохранения поствакцинальных антител, что является основным показателем антигенной активности вакцины (А.В.Васильев, 2000; G.L.McMillen et al., 1995; A.Pratelli et al., 2000 и др.).

Поэтому вопросы, связанные с разработкой и совершенствованием аналитических методов иммуноанализа на основе поли- и моноклональных антител, также как и с их использованием для изучения поствакцинального гуморального иммунного ответа у собак, являются весьма актуальными и представляют значительный интерес, как в научном, так и в практическом аспектах. Результаты подобных исследований будут иметь не только прикладное значение, но и представлять значительный интерес для ветеринарной науки в целом, способствуя дальнейшему изучению инфекционных болезней и иммунной регуляции у собак.

Цель работы. Характеристика гуморальных факторов противовирусного иммунитета у собак в процессе поствакцинального иммуногенеза.

Основные задачи исследований:

1. Отработать методику постановки, условий проведения и учета результатов реакции иммуноферментных тест-систем (ИФА), предназначенных для выявления изотип-специфических антител к парвовирусу (CPV-2) и аденовирусам собак (CAV-1 и CAV-2) в сыворотке крови животных.

2. Провести сравнительное изучение диагностической ценности традиционных серологических методов и отработанных тест-систем на основе непрямого твердофазного ИФА при оценке антигенной активности вирусных антигенов, входящих в состав отечественных поливалентных вакцин используемых для профилактики инфекционных болезней собак.

3. Изучить динамику формирования В-клеточного иммунного ответа у щенков, вакцинированных отечественными биопрепаратами. Для этого провести исследования, направленные на оценку изотип-специфического распределения антител и количественное определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови собак в процессе поствакцинального иммуногенеза.

4. Изучить взаимосвязь между концентрацией иммуноглобулинов и титром противовирусных специфических антител соответствующего изотипа в сыворотке крови иммунных щенков.

Научная новизна работы.

Отработаны чувствительные и специфичные методы непрямого твердофазного ИФА, предназначенные для выявления IgG- и IgM- специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сыворотке крови животных. С использованием разноплановых методов (РИД, ИФА, РН, РНГА, РТГА, гематологические методы) впервые проведены комплексные исследования по изучению динамики формирования иммунного ответа на вирусные антигены различной природы. Получены новые данные о количественных изменениях IgG, IgM, IgA и динамике титров вирусспецифических IgG- и IgM- антител в сыворотке крови подопытных щенков на отдельных этапах поствакцинального иммуногенеза.

Впервые проведены сравнительные исследования и установлена высокая корреляционная связь между концентрацией IgG, IgM и титром противовирусных IgG-, IgM- специфических антител в сыворотке крови иммунных щенков.

На основании сравнительных исследований подтверждены некоторые закономерности изменений гуморальных факторов противовирусного иммунитета у собак и показана ведущая роль IgG и вирусспецифических IgG-антител в процессе формирования поствакцинального иммунного ответа.

Практическая значимость исследований.

Методы непрямого твердофазного ИФА целесообразно использовать для оценки напряженности иммунитета, определения содержания материнских антител у щенков с целью корректировки сроков первой вакцинации, а также в качестве методов контроля антигенной активности соответствующих компонентов моно- и поливалентных вакцин. Кроме того, данные тест-системы могут служить дополнительным методом исследований в системе комплексной диагностики парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и аденовируса собак.

Полученные результаты являются основой для дальнейших исследований по изучению механизмов и закономерностей формирования постинфекционного и поствакцинального противовирусного иммунитета у собак.

Основные положения, выносимые на защиту.

Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- результаты экспериментов по отработке ИФА для выявления изотип-специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак;
- результаты комплексных исследований по изучению динамики формирования гуморального иммунного ответа у щенков в процессе поствакцинального иммуногенеза.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены на:

- Научно- практической конференции «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии», Краснодар, 2001;
- IV региональной конференции посвященной проблемам профилактики и лечения домашних животных и птицы, Владимир, 2001;
- Межлабораторном совещании сотрудников ВИЭВ, Москва, 2005

Публикации. По материалам диссертации опубликовано четыре научные работы.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 125 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, собственных результатов исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка цитированной литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 8 таблицами и 10 рисунками. Список литературы включает 140 источников (30 отечественных и 110 зарубежных авторов).

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 1998-2002 гг. в лаборатории иммунологии и биотехнологии ВИЭВ. Опыты на щенках проводили в клинике ВИЭВ и в виварии ФГУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория (ФГУ ЦНМВЛ, г.Москва).

1.1. Экспериментальные животные

В качестве опытной модели для оценки гуморальных факторов иммунитета использовано 20 двухмесячных беспородных щенков и помесей. В разные сроки было проведено три опыта с количеством животных 6, 7 и 7 соответственно.

Для изучения динамики формирования первичного и вторичного иммунного ответа щенков вакцинировали отечественными поливалентными вакцинами, содержащими в своем составе аттенуированный вирус чумы и инактивированные возбудители парвовирусного энтерита, аденовируса и леггоспироза собак согласно «Наставлению по применению...» каждого препарата. В опыте №1 пять из шести щенков были подвергнуты ревакцинации в возрасте 6 месяцев. В опытах №1 и №2 использовали вакцину производства ЗАО «Ветзероцентр», в опыте №3 – ЗАО «НПО НАРВАК».

Для проведения исследований использовали цельную кровь и сыворотки крови щенков, полученные на 0, 4, 7, 10, 14, 21-е сутки после первичной вакцинации и на 5, 9, 14 и 21-е сутки после вторичной. У пяти ревакцинированных через 4 месяца щенков, кровь была взята непосредственно перед инъекцией вакцины, далее на 3-е, 7-е и 14-е сутки п.и. соответственно. Перед постановкой РТГА и РН сыворотки крови щенков предварительно инактивировали в водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

1.2. Гематологические методы

Количество форменных элементов крови подсчитывали, используя стандартные методики (И.П.Кондрахин с соавт., 1985). Подсчет общего количества лейкоцитов осуществляли в камере Горяева. Для дифференциального подсчета лейкоцитов готовили мазки и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Лейкограмма выражалась как процентное отношение между отдельными видами лейкоцитов крови.

1.3. Метод радиальной иммунодиффузии по Манчини

Количественное определение содержания IgG, IgM и IgA в испытуемых сыворотках крови щенков проводили методом радиальной иммунодиффузии по Манчини. При постановке РИД специфические антисыворотки или моноклональные антитела диспергировали в агаровый гель (1,2% агара на 0,05 М веронал-мединаловом буфере, pH 8,6), смесь наносили на стекло и в застывшем агаре вырезали лунки, в которые вносили испытуемые сыворотки крови щенков. Наряду с исследуемым материалом в другие лунки вносили раствор соответствующего Ig уже известной концентрации. Пластины инкубировали в течение 24- 48 часов во влажной камере при комнатной температуре, затем отмывали в физиологическом растворе, высушивали при 37°C и красили амидо-черным 10В.

Количество Ig определяли по измерению диаметра кольца преципитации испытуемых образцов относительно калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта. В качестве стандартов использовались иммунохимически чистые иммуноглобулины каждого изотипа.

1.4. Реакция непрямой гемагглютинации

Титр антител к вирусу чумы собак определяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием «Набора эритроцитарных диагностикумов для выявления антител к вирусу чумы плотоядных» (ТУ №9384-001-00008064-96), постановку реакции и учет полученных результатов проводили согласно Наставлению по применению «Набора...».

1.5. Реакция торможения гемагглютинации

Титр антител к парвовирусу собак (CPV-2) определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА проводили с 1 % суспензией эритроцитов свиньи в фосфатном буферном растворе, pH 6,6 и культуральной вируссодержащей суспензией штамма Д-1, постановку реакции и учет полученных результатов осуществляли согласно Наставлению по применению «Набора для диагностики парвовирусных инфекций плотоядных в реакции торможения гемагглютинации» (ТУ №10-07-132-91).

В РТГА определяли титр антител к аденовирусу собак 1 и 2 серотипов (CAV-1 и CAV-2 соответственно). Для постановки РТГА использовали 0,7% суспензию эритроцитов белой крысы в забуференном физиологическом растворе, pH 6,4 и культуральные вируссодержащие суспензии штаммов ВГНКИ (CAV-1) и Ада (CAV-2). Постановку реакции и учет полученных результатов проводили согласно Наставлению по применению «Набора для обнаружения антител к возбудителям инфекционного гепатита и аде-

новироза плотоядных в реакции торможения гемагглютинации» (ТУ №9388-019-18713812-00).

1.6. Реакция нейтрализации

Реакцию нейтрализации (РН) использовали для определения титра антител к вирусу чумы собак. РН ставили микрометодом в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) по стандартной методике с постоянной дозой вируса.

1.7. Иммуноферментные тест-системы

Иммуноферментные тест-системы были использованы для определения динамики титра IgM- и IgG- специфических антител к парвовирусу и аденовирусу собак первого и второго серотипов в сыворотке крови подопытных животных. Каждая тест-система основана на непрямом варианте твердофазного ИФА, отработана применительно к каждому вирусному антигену и использовалась индивидуально.

В качестве антигенов использовали соответствующие вирусные препараты, полученные физико-химическими методами из вирусосодержащих культуральных жидкостей (О.А.Верховский, Л.В.Верховская, Е.Д.Захарова и др., 1994). В каждом полученном антигене определяли концентрацию белка по методу О.Н.Lowry (1951), анализировали его структурный состав методом электрофореза в ПААГ-ДСН и подтверждали антигенную активность в иммуноблоттинге.

В качестве конъюгатов использовали моноспецифическую антисыворотку к IgG собак и McA 1F4 к IgM собак, меченные пероксидазой хрена (Sigma, США). Синтез иммунопероксидазных конъюгатов проводили по отработанной ранее технологической схеме на основе метода R.Tijssen and E.Kurstak (1984). Их активность и специфичность определяли методом прямого твердофазного ИФА с использованием очищенных препаратов IgG, IgM и IgA собак в качестве антигенов.

Во всех вариантах ИФА использовались плоскодонные полистироловые 96-луночные микропанели для ИФА (Nunc, Дания). При постановке всех тест-систем вирусный антиген сорбировали в лунках микропанели в предварительно подобранной концентрации. На следующих этапах реакции в лунки сенсibilизированной микропанели последовательно вносили блокирующий раствор, разведения испытуемых и контрольных сывороток крови и конъюгат в рабочем титре. Разведения антигена, испытуемых проб и конъюгата готовили на предварительно подобранном буфере.

В качестве субстратной смеси использовался 0,02% о-фенилендиамин (ОФД) в 0,3 М цитратном буфере, pH 4,7, содержащем 0,01% перекиси водорода. Реакцию останавливали через 10-15 минут, добавлением в лунки по 50 мкл 8 М H₂SO₄. Результаты ИФА оценивали с помощью фотометра «Multiskan MCC/340» («Labsystems», Финляндия) при длине волны 492 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП 492).

1.8. Электрофорез в ПААГ-ДСН

Электрофорез проводили в пластинах полиакриламидного геля размером 100 x 150 x 0,75 мм в буферной системе Laemmli (1970) в "плюс-

минус" варианте (Л.В.Верховская, 1992). Разделение белков проводили при постоянной силе тока 20 мА и циркулирующем охлаждении. После электрофоретического разделения, белки в гелях окрашивали серебром (Pogto M. et al., 1982) и фотографировали в проходящем свете.

1.9. Иммуноблоттинг

Для постановки иммуноблоттинга, белки после электрофоретического разделения не окрашивали, а переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Immobilon-NC» (Millipore, США) в «полусухой» буферной системе (Kuhse-Andersen J., 1984) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа при комнатной температуре. Об эффективности переноса судили после окраски одной мембраны-реплики 0,1% раствором амидо-черного, а соответствующего ей геля- 0,03% раствором Кумасси ярко-голубого. Иммунохимическое окрашивание полученных реплик осуществляли с помощью непрямого варианта ИФА с соблюдением всех его стадий.

1.10. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при $P < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. ОТРАБОТКА МЕТОДОВ НЕПРЯМОГО ТВЕРДОФАЗНОГО ИФА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ИЗОТИП-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ПАРВОВИРУСУ И АДЕНОВИРУСАМ СОБАК

Основной целью первого этапа нашей работы была отработка методики постановки и учета результатов иммуноферментных методов исследований, направленных на выявление в сыворотке крови собак:

- 1) IgG- и IgM- специфических антител к CPV-2;
- 2) IgG- и IgM- специфических антител к CAV-1;
- 3) IgG- и IgM- специфических антител к CAV-2.

Отработка каждого из трех методов состояла из ряда последовательных этапов, при проведении которых решались следующие основные задачи:

- отработка условий сенсibilизации лунок полистироловых микроплат (твёрдая фаза) соответствующим очищенным вирусным антигеном и определение рабочего разведения иммуноферментных конъюгатов;
- подбор оптимальных режимов постановки реакции;
- оценка эффективности каждой из трех иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сравнении с результатами методов аналогичной направленности.

В качестве источника каждого вирусного антигена была использована вирусодержащая суспензия соответствующего вакцинного штамма парвовируса и аденовирусов собак первого и второго серотипов полученных из коллекции ФГУ ВГНКИ.

В качестве парвовирусного антигена использовали препарат, полученный после ультрацентрифугирования концентрированного вируса в линейном градиенте плотности 1,32 - 1,45 г/л CsCl. Очищенный вирус формировал специфическую полосу в растворе CsCl плотностью 1,44 г/л.

В качестве аденовирусных антигенов использовали препараты, полученные после очистки вирусодержащих культуральных жидкостей методами гидрофобной и анионообменной хроматографии.

После электрофоретического анализа полученных препаратов и подтверждения их антигенной активности в иммуоблоттинге, препараты были использованы в качестве антигенов в непрямом твердофазном ИФА.

В качестве иммунопероксидазных конъюгатов были использованы моносpezifическая антисыворотка к IgG и моноклональные антитела к IgM собак, меченные ферментом, полученные и хорошо охарактеризованные ранее (О.А.Верховский, 1998). Результаты проведенных исследований показали, что полученные конъюгаты строго моносpezifичны по отношению к IgG и IgM соответственно и не обладают перекрестной активностью по отношению к другим изотипам иммуноглобулинов собак.

Основным этапом работы по отработке условий постановки иммуноферментных тест-систем был выбор рабочего разведения иммунопероксидазных конъюгатов и концентрации каждого вирусного антигена. Рабочее разведение иммунопероксидазных конъюгатов, также как и концентрацию вирусных антигенов, определяли в предварительных экспериментах методом «шахматного» титрования в непрямом твердофазном ИФА. При этом в качестве положительных и отрицательных сывороток использовали сыворотки крови от переболевших или экспериментально зараженных собак с титром антител $\geq 1:128$ в РТГА и от неиммунных щенков (с отрицательной реакцией в РТГА) соответственно.

Оптимальной концентрацией вирусного антигена и рабочим разведением конъюгата считали их конечные значения, которые при взаимодействии с положительной сывороткой обеспечивали показатель ОП 492 $\geq 1,0$. При этом соответствующее значение ОП 492 в лунке с отрицательной сывороткой было минимальным (ОП 492 $\leq 0,2$).

В результате проведения экспериментов было установлено, что для сенсибилизации микропанелей очищенные вирусные антигены следует использовать в следующих концентрациях: 1) препарат очищенного парвовируса собак – 2 мкг/мл; 2) препарат, содержащий гексон и отросток пентона аденовируса собак 1 серотипа – 1 мкг/мл; 3) препарат, содержащий гексон и отросток пентона аденовируса собак 2 серотипа – 1 мкг/мл. При этом рабочие разведения иммунопероксидазных конъюгатов для всех тест-систем составляли:

А) анти- IgG собаки (поликлональный) – 1:2000;

В) анти- IgM собаки (моноклональный) – 1:500.

Для сенсибилизации вирусных антигенов в лунках полистироловых микропанелей был использован 0,05 М карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,6 (КББ). Для разведения сывороток крови собак был выбран стандартный фосфатно-буферный раствор (ФБР); в качестве промывочного буфера использовался этот же буфер, содержащий 0,05% твина-20 (ФБР1).

Для предотвращения неспецифической реакции проводили подбор блокирующего белка, испытывая бычий сывороточный альбумин (БСА), желатину, казеин, овалбумин и др. В результате в качестве раствора, блокирующего несвязавшие белок участки пластика, был выбран ФБРТ, содержащий 2% БСА.

В результате исследований была отработана универсальная методика постановки реакции общая для трех тест-систем (менялись только сорбированные вирусные антигены). Титр антител в испытуемых сыворотках определяли как последнее разведение, обеспечивающее окраску, превышающую в 2,1 раза интенсивность окраски в лунках с контрольной отрицательной сывороткой.

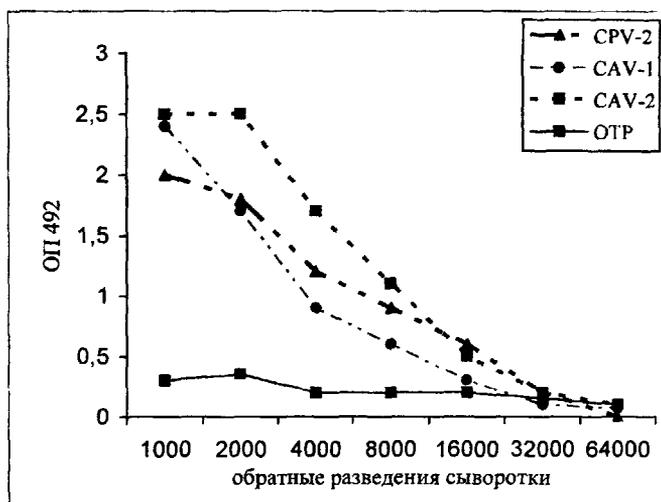


Рисунок 1. Определение титров IgG-специфических антител к парвовирусу (CPV-2) и аденовирусам собак (CAV-1 и CAV-2) в сыворотке крови щенка на 9-е сутки после повторной вакцинации отечественной поливалентной вакциной. В качестве отрицательного контроля (ОТР.) взята сыворотка крови от неиммунного щенка

Для характеристики отработанных тест-систем были исследованы сыворотки крови собак (n=81) с определенным титром специфических антител в РТГА и известным анамнезом, полученные из ряда ветеринарных клиник г. Москвы. Анализ результатов исследований по выявлению IgG-

специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в испытуемых пробах с помощью ИФА и вирус-специфических антител в РТГА свидетельствует о том, что в большинстве случаев наблюдалось совпадение в интерпретации результатов ИФА и РТГА. Так, все РТГА- положительные пробы (n=69) были положительными и в ИФА, а из 12 РТГА- отрицательных проб в ИФА 3 пробы были положительными на CPV-2 и в двух пробах присутствовали антитела к аденовирусам собак обоих серотипов.

Таким образом, в результате проведения первого этапа нашей работы была отработаны методики постановки ИФА по обнаружению IgG- и IgM-специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сыворотке крови животных (рис.1).

2.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ПРОТИВОВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА У СОБАК В ПРОЦЕССЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНОГЕНЕЗА

Основной целью нашей работы являлась характеристика гуморальных факторов противовирусного иммунитета у щенков после применения отечественных вакцинных препаратов. Исследования проводили в двух основных направлениях:

- определение гематологических показателей и количественного содержания сывороточных IgG, IgM и IgA у щенков в процессе формирования иммунного ответа;
- определение динамики титра IgM- и IgG- специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сыворотке крови подопытных животных с использованием иммуноферментных тест-систем и титра вирус-специфических антител к соответствующему возбудителю с использованием традиционных методов.

2.2.1. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Известно, что общий анализ крови позволяет выявить многие аномалии и патологические состояния животных, обусловленные нарушениями определенного звена иммунной системы и одновременно служить системно-функциональным подходом для иммунологического мониторинга организма животных на различных этапах иммуногенеза. Поэтому мы провели исследования, направленные на выявление и идентификацию возможных нарушений иммунной системы щенков после применения отечественных вакцин. Для этого была изучена динамика количественных изменений основных типов клеток иммунной системы в крови щенков в процессе поствакцинального иммуногенеза.

Исследования проведены совместно с зав. отделом серологии ФГУ ЦНМВЛ Т.И.Сидоркиной.

Материалом для проведения исследований служила цельная кровь щенков, смешанная с антикоагулянтом (1-2 капли 10% ЭДТА-натрия на 5 мл крови) и доставленная в лабораторию в день взятия. Гематологические исследования проводили в динамике после первой, второй и третьей вакцинации соответственно. Результаты, полученные при исследовании крови щенков до вакцинации, сравнивали с нормативными гематологическими показателями, приведенными в отечественной и зарубежной литературе (И.П.Кондрахин с соавт., 1985; Ю.Н.Федоров с соавт., 2000; М.Уиллард с соавт., 2004 и др.).

В результате проведенных исследований было установлено, что у клинически здоровых двухмесячных щенков общий состав периферической крови характеризуется следующими гематологическими показателями, отражающими иммунологический статус организма:

- абсолютное содержание лейкоцитов в среднем составило $7,0 \times 10^9/\text{л}$ (нормативный показатель: $6 - 16 \times 10^9/\text{л}$);
- относительное содержание палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов в среднем составило 1% и 55% (нормативные показатели: 0 - 6% и 43 - 72% соответственно);
- относительное содержание эозинофилов в среднем составило 2% (нормативный показатель: 2 - 10%);
- относительное содержание лимфоцитов и моноцитов в среднем составило 38% и 4% (нормативные показатели: 21 - 40% и 3 - 10% соответственно);
- базофилов обнаружено не было (нормативный показатель: 0 - 1 %).

Таким образом, гематологические показатели щенков до начала экспериментов соответствовали нормативным показателям и в дальнейшем являлись контрольными по отношению к результатам, полученным после проведения вакцинации.

В результате исследований было установлено, что на 4-7-е сутки после первой вакцинации в крови щенков достоверно увеличилось относительное содержание палочкоядерных нейтрофилов и на 7-е сутки - эозинофилов ($P < 0,05$), не выходящих однако за рамки нормативных показателей. Увеличение содержания этих типов клеток на ранней стадии формирования иммунного ответа могло свидетельствовать о наличии воспалительной реакции, проходящей в этот период времени в организме животных, впрочем, не отразившейся на поведении и клиническом состоянии щенков, остававшихся под наблюдением в течение всего эксперимента. Эти результаты совпадают с результатами А. Strasser с соавт. (2003) которые показали, что вакцинация взрослых собак (старше 2-х летнего возраста) приводила к увеличению содержания палочкоядерных нейтрофилов и снижению нейтрофильной активности.

В дальнейшем, процентное содержание палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов в периферической крови уменьшилось, и в процессе вторич-

ного и третичного иммунного ответа их содержание достоверно не изменялось. Таким образом, динамика содержания этих типов клеток носила временной характер.

Полученные данные показали, что в процессе поствакцинального иммуногенеза достоверных изменений средних значений содержания лейкоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов и моноцитов в периферической крови обнаружено не было.

2.2.2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ВАКЦИНИРОВАННЫХ СОБАК

Количественное определение уровня трех основных изотипов иммуноглобулинов (IgG, IgM и IgA) в испытуемых сыворотках крови щенков проводили методом РИД по Манчини

В исследованиях использовали моноспецифическую антисыворотку к IgG, моноспецифическую антисыворотку к IgA и MкA 1F4 к IgM собак, иммунохимически чистые препараты IgG, IgM и IgA собак полученные и охарактеризованные ранее в лаборатории иммунологии и биотехнологии ВИЭВ.

На первом этапе работы для унификации метода были проведены исследования по подбору оптимальных концентраций моноспецифических реагентов для внесения в гель и необходимого количества вносимых проб для анализа. Для этого в агарозу диспергировали антисыворотки в различных разведениях (от 1:10 до 1:100) и MкA 1F4 в различных концентрациях (от 1 до 200 мкг / мл). После полимеризации геля в вырезанные лунки вносили испытуемые пробы в различных объемах (от 1 до 3 мкл) и после 24-48 часовой инкубации учитывали реакцию по конечной концентрации антисыворотки или MкA, дающей четкие контуры диска преципитации с испытуемыми антигенами.

По результатам проведенных опытов установлено, что для получения достоверных результатов оптимальным разведением моноспецифической антисыворотки к IgG собак является 1:30, а моноспецифической антисыворотки к IgA собак - 1:20. Концентрация моноклональных антител 1F4 в агарозе должна составлять 4 мкг/мл. Объем вносимой пробы составлял 1 мкл для определения концентрации IgG и IgM и 2 мкл для определения концентрации IgA. В качестве стандартов были использованы иммунохимически чистые препараты иммуноглобулинов каждого изотипа.

Далее с использованием отработанного метода решалась основная задача данного раздела работы – количественная оценка сывороточных иммуноглобулинов щенков в процессе формирования иммунного ответа. Для этого были проведены исследования по определению уровня иммуноглобулинов в сыворотках крови вакцинированных собак, в результате которых было установлено, что динамика количественных изменений IgG, IgM и IgA во всех опытах была практически одинакова и имела ряд аналогичных законо-

мерностей. Статистически обработанные результаты опытов приведены в таблице 1.

Таблица 1.
Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке крови щенков

Вакцинация, (кол-во животных)	Время п.и., сутки	Содержание иммуноглобулинов, мг/мл (M ± m)		
		IgG	IgM	IgA
До вакцинации (n=20)	0	5,35 ± 0,52	1,68 ± 0,24	0,40 ± 0,06
Первая (n=20)	4	6,33 ± 0,24	1,88 ± 0,43	0,44 ± 0,15
	7	6,60 ± 0,64	2,53 ± 0,19 *	0,51 ± 0,13
	10	6,72 ± 0,78	3,47 ± 0,21*	0,60 ± 0,08*
	14	8,90 ± 1,20*	3,23 ± 0,09*	0,46 ± 0,13
	21	9,10 ± 0,80*	2,33 ± 0,46	0,48 ± 0,18
Вторая (n=20)	5	9,55 ± 0,65*	2,31 ± 0,43	0,59 ± 0,10
	9	9,70 ± 0,50*	1,86 ± 0,45	0,66 ± 0,12*
	14	9,52 ± 0,49*	1,97 ± 0,15	0,58 ± 0,09
	21	9,55 ± 0,33*	1,75 ± 0,12	0,56 ± 0,10
Перед ревакцинацией (n=5)	0	8,12 ± 1,60	1,70 ± 0,20	0,62 ± 0,10
Третья (n=5)	3	8,15 ± 0,40	2,20 ± 0,10	0,70 ± 0,24
	7	8,65 ± 0,35	1,88 ± 0,42	0,79 ± 0,15
	14	9,12 ± 0,31	1,76 ± 0,25	0,74 ± 0,19

Примечание: * - статистическая достоверность различий показателей у щенков после первой и второй вакцинации по отношению к показателям у этих же невакцинированных щенков, P < 0,05.

Данные таблицы 1 показали, что первичный, вторичный и третичный поствакцинальный иммунный ответ у щенков приводил к изменению иммуноглобулинового профиля в крови животных.

Так, на 7-е сутки после первой вакцинации концентрация IgM увеличилась на 50,6% (P < 0,05) и на 10-е сутки достигла своего максимума (3,47 ± 0,21 мг/мл). В этот промежуток времени содержание иммуноглобулинов данного изотипа увеличилось более чем в 2 раза, и было самым высоким по сравнению с аналогичными показателями как у неиммунных щенков, так и у щенков после последующих введений вакцины. Далее концентрация иммуноглобулинов данного изотипа начала постепенно снижаться, и в процессе формирования иммунного ответа, обусловленного T- и B- клетками

формирования иммунного ответа, обусловленного Т- и В- клетками памяти (после второй инъекции вакцины), его количественные показатели не имели выраженной тенденции к изменению и находились в пределах своих возрастных норм, определенных для данного вида животных.

Анализ полученных результатов по количественной характеристике иммуноглобулинов показал, что наблюдается выраженная зависимость содержания IgG от срока с начала формирования поствакцинального иммунного ответа. Так в сравнении с контрольными показателями, концентрация IgG достоверно увеличилась на 14-21-е сутки после первой вакцинации (на 66% и 70% соответственно, $P < 0,05$) и оставалась таковой в течение всего периода после второй. При этом максимальное значение содержания IgG ($9,70 \pm 0,50$ мг/мл) в сыворотке крови вакцинированных щенков было установлено на 9-е сутки после повторной инъекции вакцины. Через 4 месяца уровень IgG незначительно снизился, а к 14-м суткам после проведения ревакцинации вновь увеличился до $9,12 \pm 0,31$ мг/мл (срок наблюдения).

Клиническое значение IgA в поствакцинальном противовирусном иммунном ответе у щенков практически не изучено. В наших опытах у щенков в процессе первичного и вторичного иммунного ответа наблюдалась тенденция к увеличению, а затем к постепенному снижению содержания иммуноглобулинов данного изотипа в сыворотке крови исследуемых животных. В сравнении с контрольными показателями статистически достоверное повышение уровня IgA было зарегистрировано на 10-е сутки после первой и на 9-е сутки после повторной инъекции вакцины (на 50% и 65% соответственно, $P < 0,05$). Максимальный уровень IgA, также как и IgG, был установлен на 9-е сутки после повторной инъекции вакцины и составил $0,66 \pm 0,12$ мг/мл.

Ревакцинация шестимесячных щенков не приводила к достоверным изменениям концентрации сывороточных иммуноглобулинов всех трех изотипов.

2.2.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУС-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У СОБАК В ПРОЦЕССЕ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНОГЕНЕЗА

Для изучения динамики формирования гуморального поствакцинального иммунного ответа у щенков и оценки диагностической ценности отработанных методов ИФА, предназначенных для выявления IgM- и IgG- специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак, в каждой испытуемой пробе сыворотки крови щенков определяли:

- 1) титр антител к CDV, CPV-2, CAV-1 и CAV-2 с помощью традиционных серологических тестов;
- 2) титр IgM- и IgG- специфических антител к CPV-2, CAV-1 и CAV-2 с помощью иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления антител к каждому вирусу отдельно.

Исследования проводили совместно с к.в.н. Е.Д.Захаровой.

2.2.3.1. ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ЧУМЫ СОБАК

Титр антител к CDV в сыворотке крови испытуемых щенков определяли в традиционных серологических тестах: РНГА и в РН. Результаты исследований во всех проведенных экспериментах статистически обработаны и приведены на рисунке 2.

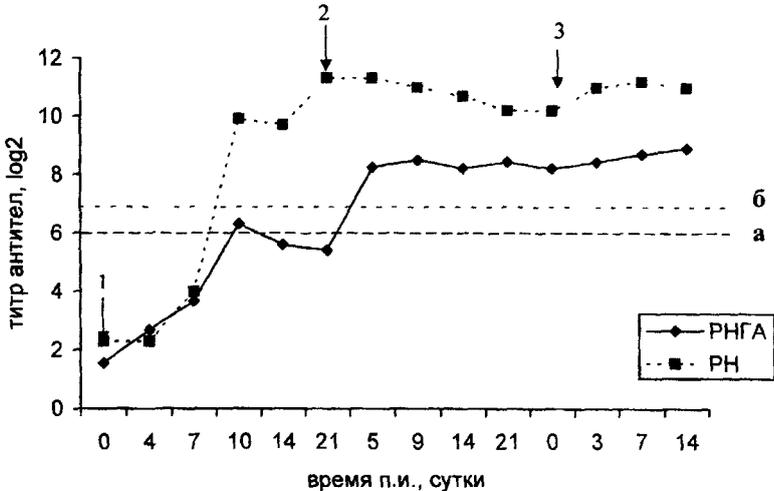


Рисунок 2. Динамика содержания поствакцинальных антител к CDV в сыворотках крови щенков. Приведены средние геометрические значения титров антител, выраженных в \log_2 . Стрелками показано время первой (1), второй (2) и третьей вакцинации (3)

Пунктирными линиями показаны значения протективного титра антител а) в РНГА (1:64 или $6,0 \log_2$; А.В.Васильев, 2000) б) в РН (1:100 или $6,64 \log_2$; В Н Сюрин с соавт., 1998)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у большинства подопытных невакцинированных двухмесячных щенков в сыворотке крови обнаружены антитела к вирусу чумы собак (в 16 случаев из 20) в титрах 1:2-1:16 как в РНГА, так и в РН. Однако, согласно литературным данным, этот уровень антител не обеспечивает устойчивости животного к заражению вирулентным вирусом (D.L.McCaw et al, 1998; А.В.Васильев, 2000 и др.).

Как видно из данных рисунка 2, формирование выраженного поствакцинального гуморального иммунного ответа к вирусу чумы собак происходило после первой вакцинации и в первые 9 суток после второй. В эти сроки уровень антител к CDV, определяемых в РН и РНГА, повышался и достигал своего максимума на 21-е сутки первичного ($11,4 \pm 1,7 \log_2$ в РН) и на 9-е сутки вторичного ($8,5 \pm 1,1 \log_2$ в РНГА) иммунного ответа.

Третичный гуморальный иммунный ответ к вирусу чумы собак после ревакцинации шестимесячных щенков, обусловленный Т- и В- клетками па-

мости, не сопровождался достоверным увеличением титров антител, определяемых двумя методами.

При сравнительном анализе результатов РНГА и РИ установлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью этих двух методов ($r=0,9$, $P < 0,05$).

2.2.3.2. ДИНАМИКА ТИТРА И ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ IgM- и IgG- СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ К ПАРВОВИРУСУ СОБАК

Титр антител к парвовирусу собак определяли в РТГА, титр IgM- и IgG- специфических антител к CPV-2 – в ИФА. Статистически обработанные результаты исследований по определению титра антител в сыворотке крови испытуемых щенков двумя методами во всех проведенных экспериментах приведены на рисунках 3-4.

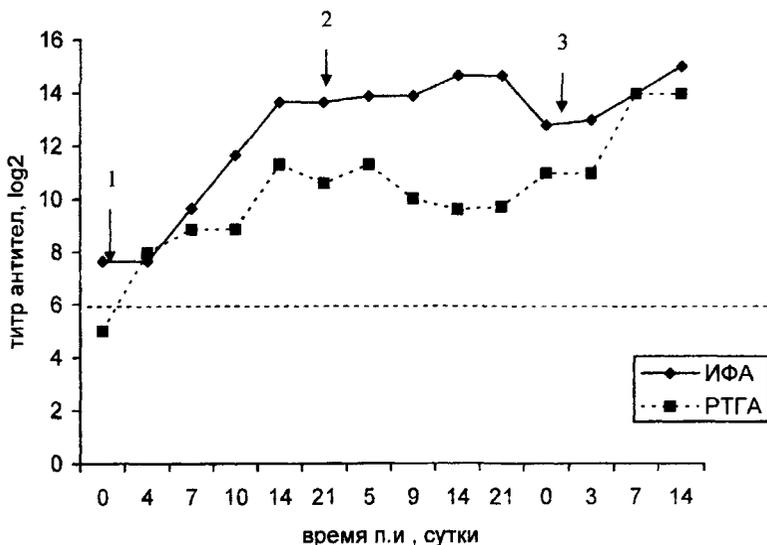


Рисунок 3. Сравнительные результаты содержания поствакцинальных антител к CPV-2 в сыворотках крови щенков. Приведены средние геометрические значения титров антител, выявляемых в ИФА и РТГА и выраженных в \log_2 . Стрелками показано время первой (1), второй (2) и третьей вакцинации (3). Пунктирной линией показано значение протективного титра антител в РТГА ($\geq 1:64$ или $6,0 \log_2$ согласно данным S.A. Fiscus et al., 1985, M.J.G. Appell et al., 1987; М.М.Рахманиной, 1993 и др.)

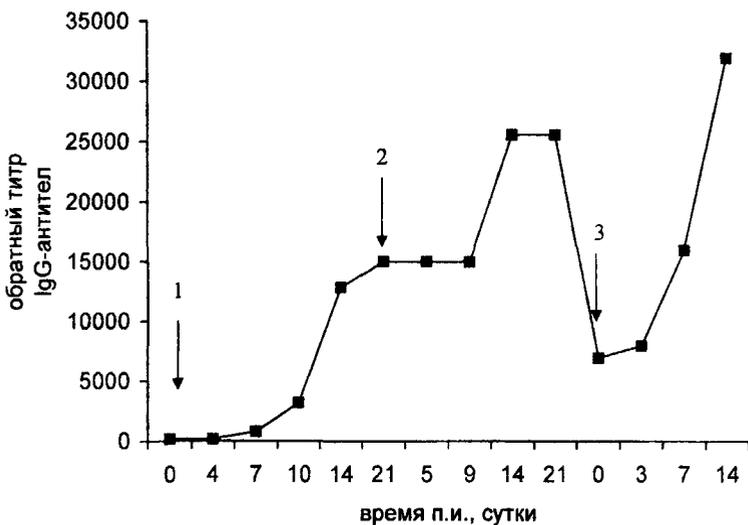
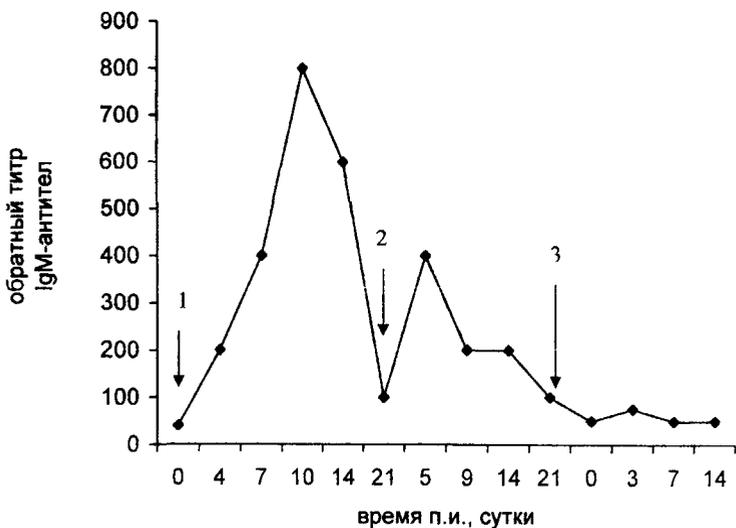


Рисунок 4. Динамика содержания поствакцинальных антигел к парвовирусу собак в сыворотках крови щенков. Приведены средние геометрические значения обратных титров антигел. Стрелками показано время первой (1), второй (2) и третьей вакцинации (3).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что у большинства подопытных двухмесячных щенков в сыворотке крови обнаружены антитела к парвовирусу собак (в 18 случаев из 20) как в РТГА, так и в ИФА. Причем у четырех из них титр в РТГА был $\geq 1:128$, т.е. превышал значение протективного уровня. В ИФА титры IgM- и IgG- специфических антител достигали значений $1:160$ ($7,3 \log_2$) и $1:400$ ($8,6 \log_2$) соответственно.

Результаты ИФА и РТГА свидетельствуют о формировании выраженного поствакцинального гуморального иммунного ответа к парвовирусу собак у всех щенков. Так после первой вакцинации титр вирус-специфических антител, обнаруживаемых в РТГА, увеличился на $4-5 \log_2$ соответственно по сравнению с контрольными показателями и достиг своего максимума на 14-е сутки п.и. ($11,3 \pm 0,5 \log_2$). Вторая вакцинация не приводила к значительным изменениям в содержании антител выявляемых в РТГА, их титр даже был несколько ниже по отношению к достигнутому ранее максимуму. Однако в любом случае он был значительно выше протективного показателя и сохранялся на этом уровне вплоть до проведения ревакцинации (у пяти щенков бывших в опыте).

Поскольку практически у всех щенков до вакцинации (0 сутки) в сыворотке крови были обнаружены как IgM- так и IgG- антитела к CPV-2 в различных титрах, то первая инъекция поливалентной вакцины стимулировала формирование как IgM- так и IgG-иммунного ответа у всех исследованных животных. При этом содержание IgM-специфических антител в сыворотке крови щенков начинало достоверно увеличиваться на 4-с сутки п.и. и достигало своего максимального значения на 10 сутки (средний титр $1:800$), далее титр антител данного изотипа резко снижался. Однако даже в период своего максимального подъема, уровень IgM- антител превышал уровень IgG- антител аналогичной специфичности только у 6 щенков, в большинстве же случаев IgG- антитела доминировали не только во вторичном, но и в первичном иммунном ответе.

Вторая вакцинация приводила к незначительному повышению титра IgM-специфических антител на 5-е сутки п.и, далее антитела данного изотипа не играли значимой роли в иммунном ответе.

После первой вакцинации содержание сывороточных вирус- специфических антител, относящихся к IgG- изотипу, происходило постепенно, достигая своего максимального значения к моменту вторичной вакцинации (21-е сутки п.и.). Вторичный иммунный ответ у щенков характеризовался дальнейшим повышением содержания IgG- антител в сыворотке крови, которые достигали своего максимального значения на 14-21-е сутки после повторной вакцинации животных и циркулировали в организме длительное время.

У пяти ревакцинированных щенков титры IgG- антител к CPV-2 перед введением препарата достигали $10-12 \log_2$, а на 14-е сутки п.и. возрастали до $13-15 \log_2$ соответственно.

Таким образом, ревакцинация шестимесячных щенков приводила к достоверному повышению уровня антител к CPV-2, определяемых как в

РТГА, так и в ИФА, и в большинстве случаев относящихся к IgG- изотипу. Во всех проведенных экспериментах установлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью РТГА и ИФА ($r=0,77$, $P < 0,05$).

2.2.3.3. ДИНАМИКА ТИТРА И ОЦЕНКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ IgM- и IgG- СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ К АДЕНОВИРУСАМ СОБАК

Титр антител к САУ-1 и САУ-2 в сыворотке крови экспериментальных животных определяли в РТГА (табл.2). Для определения динамики титров IgM- и IgG- антител к антигенам САУ-1 и САУ-2 были использованы соответствующие методы ИФА (рис.5).

Таблица 2.

Динамика титров антител в РТГА к аденовирусам собак в сыворотке крови щенков

Вакцинация, (кол-во животных)	Время п.и., сутки	Титр антител, $\log_2 (M \pm m)$	
		к САУ-1	к САУ-2
До вакцинации (n=20)	0	$3,2 \pm 1,4$	$5,4 \pm 0,6$
Первая (n=20)	4	$3,6 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,15$
	7	$4,8 \pm 0,8^*$	$6,7 \pm 0,13^*$
	10	$4,75 \pm 1,1^*$	$6,75 \pm 1,1^*$
	14	$5,05 \pm 1,7^*$	$6,56 \pm 1,13^*$
	21	$5,6 \pm 0,8^*$	$6,08 \pm 1,2^*$
Вторая (n=20)	5	$5,6 \pm 1,25^*$	$7,7 \pm 0,9^*$
	9	$6,3 \pm 0,24^*$	$7,86 \pm 0,8^*$
	14	$6,3 \pm 0,8^*$	$7,58 \pm 0,6^*$
	21	$6,1 \pm 1,4^*$	$7,56 \pm 0,5^*$
Перед ревакцинацией (n=5)	0	$5,4 \pm 0,2$	$7,65 \pm 0,5$
Третья (n=5)	3	$5,9 \pm 0,5$	$8,15 \pm 1,2$
	7	$6,8 \pm 0,5$	$8,75 \pm 1,1$
	14	$6,6 \pm 0,4$	$8,75 \pm 0,8$

Примечание: * - статистическая достоверность различий показателей у щенков после первой и второй вакцинации по отношению к показателям у этих же невакцинированных животных, $P < 0,05$.

Из данных таблицы 2, видно, что титр антител выявляемых в РТГА, достоверно увеличивался на 7-е сутки после первой вакцинации и достигал максимальных значений на 9 – 14-е сутки вторичного иммунного ответа. При этом прирост специфических антител составлял 1,3 – 1,6 и 2,4 – 3,1 \log_2 соответственно.

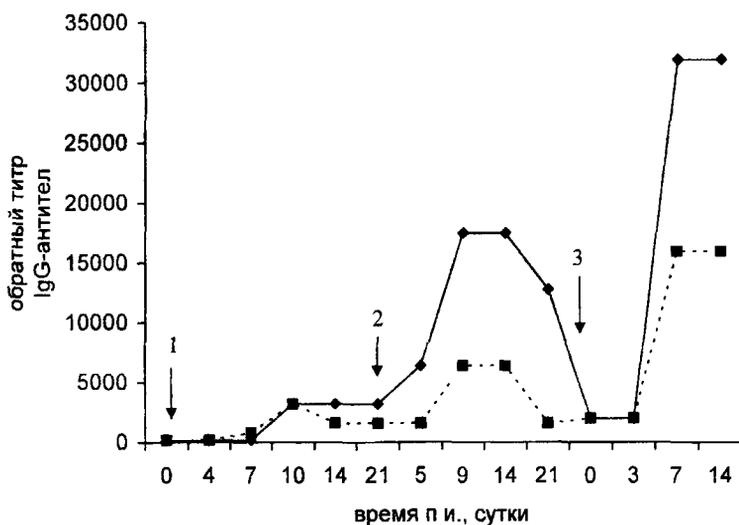
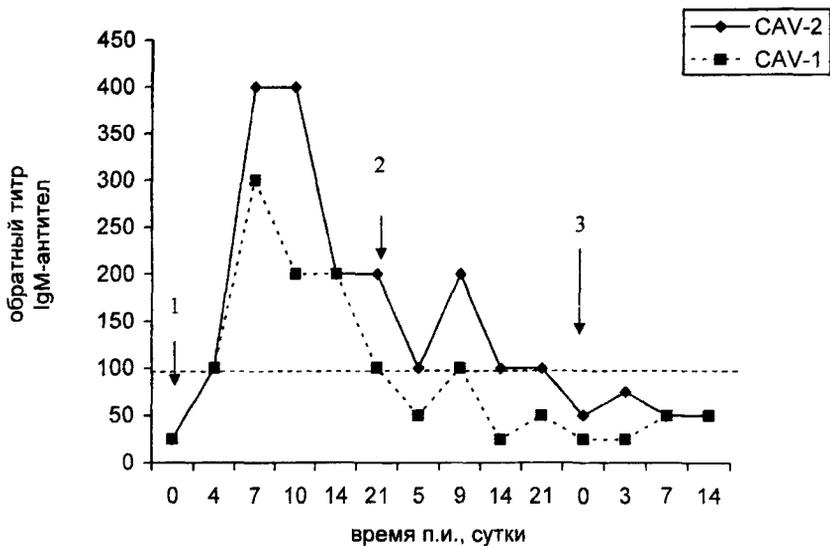


Рисунок 5. Динамика содержания поствакцинальных антител к аденовирусам собак (CAV-1 и CAV-2) в сыворотках крови щенков. Приведены средние геометрические значения обратных титров антител. Стрелками показано время первой (1), второй (2) и третьей вакцинации (3). Пунктирной линией показано значение отрицательной реакции в ИФА ($\leq 1:100$).

У шестимесячных щенков перед ревакцинацией титр антител к САV-1 составлял $5,4 \pm 0,2 \log_2$ к САV-2 – $7,65 \pm 0,5 \log_2$, а в период максимального подъема (7-е сутки п.и.) – $6,8 \pm 0,5$ и $8,75 \pm 1,1 \log_2$ соответственно. Таким образом, после первой вакцинации титр антител к аденовирусам возрастал более чем в 2,5 раза, после второй – более чем в 4 раза и после ревакцинации немногим более чем в 2 раза.

Следовательно, применение отечественных вакцин стимулировало формирование выраженного иммунного ответа к аденовирусам обоих серотипов, уровень которых обеспечивает протективный эффект (по данным Е.Д.Захаровой и В.И.Уласова, 1995, наличие антител к САV-1 и САV-2 в сыворотке крови в титре $\geq 4 \log_2$ обеспечивает защиту животных от аденовирусных инфекций).

Анализ полученных результатов, приведенных на рисунке 5, свидетельствует о том, что у всех щенков до вакцинации (0 сутки) в сыворотке крови были обнаружены как IgM- так и IgG- антитела к аденовирусам обоих серотипов. На 7-е и на 10-е сутки после первой вакцинации отмечалось максимальное увеличение содержания IgM- специфических антител к САV-1 и САV-2 соответственно.

Как первая, так и вторая инъекции поливалентных вакцин стимулировала формирование выраженного IgG-иммунного ответа к аденовирусам собак первого и второго серотипов у всех исследованных животных, что выражалось в логарифмическом нарастании титров антител данного изотипа. При этом их максимальное значение, установленное на 9-14-е сутки после повторной вакцинации животных, достигло $1:6400$ ($12,6 \log_2$) к САV-1 и $1:17500$ ($14,1 \log_2$) к САV-2 соответственно. Перед ревакцинацией пяти щенков титры IgG-антител снизились до $1:2000$ ($10,97 \log_2$), а на 7 – 14-е сутки после введения препарата возрастали до $1:16000$ ($13,97 \log_2$) к САV-1 и $1:32000$ ($14,97 \log_2$) к САV-2 соответственно.

Таким образом, поствакцинальный гуморальный иммунный ответ к САV-1 и САV-2 характеризовался достоверным увеличением содержания специфических антител на 4 – 7-е сутки после первой вакцинации (IgM-изотипа и IgG-изотипа к САV-1), на 9 – 14-е сутки после второй (IgG-изотипа) и на 7 – 14-е сутки после третьей (IgG-изотипа).

При этом также как и в случае с антителами к CPV-2, IgG- антитела к САV-1 и САV-2 являлись доминирующим изотипом антител на всех этапах иммуногенеза. Увеличение содержания вирусспецифических антител, принадлежащих к IgM-изотипу, происходило только на ранней стадии первичного иммунного ответа.

Установлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью ИФА и РТГА. При определении титров специфических антител к аденовирусу собак первого серотипа коэффициент корреляции результатов, полученных двумя методами, составил 0,9, при определении титров специфических антител к САV-2 – 0,79 соответственно.

2.2.3.4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ РИД И ИФА

Для проведения корреляционного анализа были использованы результаты исследований по:

- 1) количественному определению уровня IgG и IgM методом РИД (табл.1);
- 2) определению титров IgM- и IgG- специфических антител к CPV-2, CAV-1 и CAV-2 методом ИФА (рис. 4-5).

Коэффициент корреляции результатов (коэффициент корреляции Пирсона) вычисляли с использованием программы Excel для Windows.

Полученные результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Корреляционный анализ результатов содержания вирусспецифических IgG- и IgM- антител (ИФА) и общего количества IgG и IgM (РИД)

Антиген	Коэффициент корреляции (r) результатов ИФА/РИД	
	IgG- / IgG	IgM- /IgM
CPV-2	0,9	0,87
CAV-1	0,6	0,69
CAV-2	0,76	0,75

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что во всех случаях установлена высокая корреляционная связь между концентрацией иммуноглобулинов G- или M- изотипа, определенной в РИД, и титром противовирусных специфических антител соответствующего изотипа, установленным в ИФА.

При сравнении результатов содержания гетерологичных иммуноглобулинов и вирус-специфических антител (например, IgG/IgM- антител) была установлена обратная (отрицательная) корреляция результатов во всех случаях.

3. ВЫВОДЫ

1. Оработаны методы непрямого твердофазного ИФА, предназначенные для выявления IgG- и IgM- специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сыворотке крови животных. Получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что ИФА является высокочувствительным, специфичным, информативным и воспроизводимым методом определения вирус-специфических антител определенного изотипа.

2. Впервые проведены комплексные исследования с использованием РИД, ИФА, традиционных гематологических и серологических методов и установлены закономерности в развитии поствакцинального гуморального иммунного ответа у щенков, вакцинированных отечественными поливалент-

ными вакцинами, предназначенными для профилактики чумы, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и аденовируса собак. Показано, что используемые вакцины не обладают иммуносупрессивным действием и могут применяться для массовой вакцинопрофилактики. Во всех случаях установлены статистически достоверные различия между уровнем антител у щенков до и после применения препаратов ($P < 0,001$).

3. В опытах по определению специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак первого и второго серотипов установлена положительная корреляция результатов, полученных с помощью ИФА и РТГА ($r = 0,77; 0,9$ и $0,79$ соответственно).

4. Дана количественная характеристика IgG, IgM, IgA в сыворотке крови подопытных животных и установлено, что концентрация IgM была максимальной на 10-е сутки после первой вакцинации ($3,47 \pm 0,21$ мг/мл), а IgG и IgA – на 9-е сутки после повторной инъекции вакцины ($9,70 \pm 0,50$ и $0,66 \pm 0,12$ мг/мл соответственно). Показано, что одно- и двукратная вакцинация двухмесячных щенков отечественными поливалентными препаратами приводила к значительному повышению уровня сывороточного IgG.

5. В экспериментальных исследованиях изучена динамика и определены сроки повышения и максимального содержания IgG- и IgM- специфических антител к парвовирусу и аденовирусам собак в сыворотке крови щенков в процессе поствакцинального иммуногенеза. Установлено, что в ранние сроки первичного иммунного ответа (4 – 10-е сутки) достоверно возрастает содержание вирус-специфических антител IgM- изотипа. После второй вакцинации и ревакцинации щенков в 6-ти месячном возрасте их роль в гуморальном иммунном ответе является незначительной. Установлено закономерное нарастание титров вирусспецифических IgG-антител после каждой инъекции вакцин и их ведущее значение в поствакцинальном иммуногенезе.

6. Установлена высокая корреляционная связь между концентрацией иммуноглобулинов в сыворотке крови иммунных щенков и титром противовирусных специфических антител соответствующего изотипа. Так, у подопытных животных установлена положительная корреляция результатов между количественным содержанием IgG и титром IgG- специфических антител к парвовирусу собак ($r = 0,9$, $P < 0,05$), аденовирусу первого ($r = 0,6$, $P < 0,05$) и второго ($r = 0,76$, $P < 0,05$) серотипов. Аналогичная высокая корреляционная связь установлена между количественным уровнем IgM и титром IgM-специфических антител к CPV-2 ($r = 0,87$, $P < 0,05$), CAV-1 ($r = 0,69$, $P < 0,05$) и CAV-2 ($r = 0,75$, $P < 0,05$) соответственно.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Тест-системы на основе непрямого твердофазного ИФА могут быть рекомендованы в качестве методов оценки иммунного статуса, контроля антигенной активности соответствующих компонентов моно- и поливалентных вакцин, а также в качестве дополнительных методов диагностики парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита и аденовируса собак.

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. О.А.Верховский, Ю.Н.Федоров, А.Ю.Ханис, Т.В.Борзенко. Влияние препарата Риботан на антигенную активность вакцины против парвовирусного энтерита собак // Материалы научно- практической конференции «Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии», посвященной 55-летию Краснодарской НИВС, Краснодар, 2001, с.67.

2. Т.В.Борзенко, Е.Д.Захарова, О.А.Верховский, А.А.Курносков. Оценка антигенной активности ассоциированной вакцины для собак // Материалы IV региональной конференции «Золотое кольцо России» посвященной проблемам профилактики и лечения домашних животных и птицы, Владимир, 2001, с. 34-35.

3. Т.В.Борзенко, О.А.Верховский. Динамика содержания изотип-специфических антител в сыворотке крови вакцинированных щенков // Труды ВИЭВ, 2003, том № 73, с. 221-224.

4. Т.В.Борзенко. Количественная характеристика иммуноглобулинов сыворотки крови щенков после вакцинации // Труды ВИЭВ, 2003, том № 73, с. 224-227.

Принято к исполнению 18/07/2005
Исполнено 19/07/2005

Заказ № 960
Тираж: 90 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Балаклавский пр-т, 20-2-93
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

РНБ Русский фонд

2007-4

8057

15 ноя. 2007

