

На правах рукописи

Латфуллин Дамир Наилевич

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ РАДИОИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ
“ГАММАВАК-ВНИВИ” ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ**

16.00.03. – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



Казань – 2003

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана и в лаборатории иммунологического контроля и мониторинга болезней свиней Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (г. Казань).

Научный руководитель – доктор ветеринарных наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
М.А.Сафин

Научный консультант – доктор биологических наук
Г.Х.Ильясова

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Р.Г.Госманов
доктор ветеринарных наук, профессор
Р.Н.Низамов

Ведущая организация: Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия

Защита состоится 25 декабря 2003 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д – 220.034.01 при Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана (420074, г.Казань, Сибирский тракт, 35).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана.

Автореферат разослан 20 декабря 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

М.С.Ежкова

2003-A
18967

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. Болезнь Ауески является распространенной вирусной болезнью сельскохозяйственных, диких животных и пушных зверей, наносящая значительный экономический ущерб особенно странам с развитым свиноводством.

Наряду с вирусвакцинами стратегия и тактика борьбы с болезнью Ауески требуют наличия эффективной инактивированной вакцины, которую можно рекомендовать для вакцинации свиней на всех стадиях супоросности в репродукторных фермах с целью ограничения вирусоносительства, а также вакцинации новорожденных поросят.

В этой связи научно-практический интерес представляют изучение воздействия ионизирующего излучения на вирус болезни Ауески для получения инактивированного вирусного препарата и изучение его иммунобиологических свойств.

1.2. Цель и задачи исследований. Целью настоящих исследований являлось научно-теоретическое обоснование возможности получения инактивированной гамма-лучами вакцины против болезни Ауески и изучение ее иммунобиологической активности. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

- подобрать оптимальную систему культивирования вируса болезни Ауески;
- разработать способ инактивации вируса болезни Ауески;
- определить полноту инактивации вируса, его безвредность и антигенность;
- изучить иммуногенные свойства вакцины из инактивированного вируса на различных животных.
- подобрать качественный иммуностимулятор для повышения иммуногенности вакцины;
- определить эффективность инактивированной вакцины и стабильность ее свойств при хранении.

1.3. Научная новизна. Впервые получен радиоинактивированный антиген вируса болезни Ауески с сохранением его антигенных и иммуногенных свойств. Разработана технология изготовления инактивированной гамма-лучами вакцины (Гаммавак-ВНИВИ) против болезни Ауески.

Выбрана чувствительная культура клеток невриномы гассерова узла крысы (НГ УК-1) для репликации вируса.

Отработан режим инактивации инфекционности вируса болезни Ауески радиационным излучением ⁶⁰Со в определенном режиме экспозиции.

Подобран иммуностимулятор для вакцины из инактивированного вируса.

Вакцина из радиоинактивированного вируса экспериментально испытана на различных видах животных. И установлена выработка

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 июл 2003 г. акт 459

специфических антител, превышающая минимальный уровень защиты животных от заражения вирусом болезни Ауески.

1.4. Научно-практическая ценность работы. На основании проведенных исследований разработана технология изготовления радиоинaktivированного антигена вируса болезни Ауески. Впервые изготовлена инаktivированная сухая культуральная вакцина "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески, научно экспериментально обоснована её иммуногенность для различных видов животных.

Практическая реализация разработок определена следующими проектами нормативно-технических документов:

- Методические рекомендации по адаптации и культивированию вируса болезни Ауески на чувствительной культуре клеток невриномы гассерова узла крысы (НГУК-1), утвержденные директором ВНИВИ « 07 » сентября 2001г.

- Методические рекомендации по изготовлению и применению радиоинaktivированного антигена вируса болезни Ауески, утвержденные директором ВНИВИ « 19 » февраля 2002 г.

1.5. Апробация работы. Результаты выполненных исследований доложены и обсуждены на отчетных сессиях ВНИВИ (2000-2003), на международной конференции ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвященной 125-летию Н.А.Сошестввенского (г.Казань, 2001), международной научно-практической конференции "Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, крейтцфельда-якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена" (г. Покров, 2001), на научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии (г.Казань,2001), на конференции, посвященной 75-летию образования НИИ микробиологии МО РФ (г. Киров, 2003), на международной научно-практической конференции посвященной 45-летию создания ВНИИВВиМ (г. Покров, 2003), на международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы патологии животных" (г. Владимир, 2003).

1.6. Публикация результатов исследования. По материалам проведенных исследований опубликовано 5 работ, 2 Методических указания и 2 работы сданы в печать в журнал "Вопросы вирусологии" и "Ветеринарный врач".

1.7. Основные положения, выносимые на защиту.

Радиационная инаktivация вируса болезни Ауески позволяет сконструировать инаktivированную вакцину, обладающую иммуногенной активностью для различных видов лабораторных и сельскохозяйственных животных.

Радиоинaktivированный вирус вирулентного (Производственный) и вакцинного (БУК-628) штаммов вируса болезни Ауески является безвредным,

обладает высокой антигенностью и иммуногенностью и не обладает аллергизирующими свойствами.

Иммуногенность радиоинaktivированной вакцины возрастает в 2,4 раза при применении водорастворимого иммуностимулятора ксимедон в составе прививочной дозы.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы и приложений. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 2 рисунками. Указатель литературы содержит 139 отечественных и 105 иностранных источников.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии КГАВМ и в лаборатории иммунологического контроля и мониторинга болезней свиней ВНИВИ (г. Казань), № гос. регистрации 01200202602.

В работе были использованы: вирулентный вирус штамм "Производственный", имеющий типичную таксономическую характеристику; живая вирусвакцина против болезни Ауески из штамма "БУК-628" (ВНИВИ) ТУ-46-21-380-77; радиоинaktivированная гамма-излучением вирусвакцина "Гаммавак-ВНИВИ".

Культивирование вируса болезни Ауески осуществляли в перевиваемых культурах клеток невриномы гассерова узла крысы (НГУК-1), клетках почек сирийского хомячка (ВНК-21), клетках почек поросенка (РК-15).

Для экспериментов использовали лабораторных животных: 280 белых крыс, массой 180-200 г; 38 кроликов, массой 1,5-2 кг; 18 овец, массой 40-45 кг; 18 мышей линии BALB/c.

В качестве иммуностимуляторов использовали полный адъювант Фрейнда, содержащий $0,85\text{ см}^3$ вакцинного масла, $0,15\text{ см}^3$ естественных восков, 1 мг/см^3 убитых *M. Tuberculosis*; вакцинное масло – марки ПЭС 3М, ТУ-6-02-4-5-98; ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-N-(β -оксоэтил)-пиримидон-2), синтезированный в институте органической и физической химии (ИОФХ) имени А.Е. Арбузова КНЦ РАН РФ.

Исследования проводили с применением следующей аппаратуры, приборов и оборудования: вакуум – сушильная установка "Edwards", гамма-установка "Исследователь", микроскоп биологический МБИ-3, микротитратор системы "Takachi", спектрофотометр "Titrotek multiscan", пипетки 8-12 канальные автоматические "Flow laboratories".

Инактивацию вируса болезни Ауески проводили воздействием формальдегида в концентрации 0,3-0,5% при комнатной температуре (рН 8,0-8,4), с нейтрализацией реагирующей смеси добавлением

эквивалентного количества метабисульфита натрия; воздействием на вирус гамма-излучения.

Авирулентность антигена проверяли на чувствительной культуре клеток НГУК-1 при нанесении на монослой клеток инактивированного антигена в цельном виде и в разведениях от 1:2 до 1:16 по 0,1 мл, после чего во флаконы вносили питательную среду (без сыворотки). Отсутствие ЦПД считалось полной инактивацией вируса.

Очистку вирусосодержащей суспензии от клеточного детрита проводили путем отстаивания и центрифугирования. Степень очистки вирусосодержащей культуральной жидкости определяли по снижению количества белка в пробе. Концентрацию белка в пробах определяли биуретовой реакцией. Для концентрирования использовали полиэтиленгликоль мол.м. 4000-6000.

Серологические исследования осуществляли методами: реакцией вируснейтрализации (РН) на чувствительной культуре клеток НГУК-1 по общепринятой методике с двукратными разведениями исследуемых сывороток и постоянной дозой вируса штамма "Производственный" (100-1000 ТЦД_{50/0,1мл}) (ГОСТ № 257.53); иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием антигенного пероксидазного конъюгата в соответствии с "Методическими указаниями по применению набора препаратов для оценки в ИФА эффективности вакцинопрофилактики и фармакологической коррекции иммунитета при псевдобешенстве (болезни Ауески)", утвержденными директором ВНИВИ академиком АН РТ А.З.Равиловым 29.06.1998 г; реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА), с использованием "Набора препаратов для определения в РНГА специфических антител у свиней при болезни Ауески" в соответствии с "Методическими указаниями по применению набора препаратов для определения в РНГА специфических антител у свиней при болезни Ауески", утвержденными директором ВНИВИ академиком АН РТ А.З.Равиловым 24.11.1998г.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Получение радиоинактивированного вируса болезни Ауески

3.1.1. Определение спектра чувствительности культур клеток к вирусу болезни Ауески

При подборе биологической системы, обеспечивающей максимальное накопление вирусосодержащего материала использовали базовые культуры клеток почек сирийского хомячка (ВНК-21), почек поросят (РК-15), а также культуру клеток невриномы гассерова узла крысы (НГУК-1).

Клетки невриномы гассерова узла крысы оказались наиболее чувствительными к нейротропному вирусу болезни Ауески и обеспечили больший выход вируса за 20 часов против 72 часов на других клетках.

3.1.2. Подбор оптимальной системы культивирования вируса болезни Ауески

Титры накопления вируса в культуре клеток НГУК-1 к 18-20 ч достигали 7,75-8,0 lg ТЦД₅₀, а в культуре клеток ВНК-21 и РК-15 вирусы достигали титра 6,50-6,75 и 6,25-6,5 lg ТЦД₅₀ лишь к 72 ч инкубации соответственно.

3.1.3. Разработка способа инактивации вируса болезни Ауески

3.1.3.1. Определение режимов радиоинактивации вируса болезни Ауески

Инактивацию вирусной биомассы проводили совместно с сотрудниками лаборатории радиационной патологии ВНИВИ (г.Казань) на гамма-установке "Исследователь".

Для изучения радиочувствительности вируса болезни Ауески в опыт были взяты образцы культуральных суспензий НГУК-1, ВНК-21, РК-15, в которых была проведена репродукция вируса.

Для изучения инактивирующей дозы ионизирующего излучения испытывали различные режимы облучения с возрастающей дозой гамма-лучей в диапазоне доз от 5, 10, 15, 20, 25, 30 до 35 кГр.

Гамма-облучение вируса в дозе от 5 до 20 кГр не вызывало полной инактивации вирулентности и цитопатогенное действие его сохранялось в титре 2,5 – 3,0 lg ТЦД_{50,0,1 см³}. Доза облучения 25-30 кГр обеспечивала полную инактивацию вирулентности вирионов независимо от видовой принадлежности культуры клеток, на которой репродуцировался вирус.

3.1.3.2. Проверка полноты инактивации вируса

Полноту инактивации (авирулентности) вируса проверяли на чувствительной культуре клеток невриномы гассерова узла крысы (НГУК-1) при внесении на монослой клеток инактивированного вируса в цельном виде и в разведениях 1:2.... 1:16 по 0,1 см³, после чего во флаконы вносили питательную среду (без сыворотки). На каждое разведение использовали по 4 флакона и не менее 4 оставляли незараженными в качестве контроля. Инкубировали в термостате при 37⁰С в течение 96 часов. Для исключения размножения вируса и проявления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса проводили второй и третий пассажи.

3.2. Изучение иммунобиологической активности радиоинактивированного вируса болезни Ауески

3.2.1. Определение безвредности радиоинактивированного вируса

Безвредность радиоинактивированного вируса изучали на белых мышах, белых крысах и кроликах. Опытным животным вводили инактивированный вирус подкожно в область спины в дозе 30 мг/кг, контрольным животным вводили вирулентный вирус болезни Ауески в дозе 10⁵ ЛД₅₀ подкожно по 0,5 см³ подкожно в область спины. За животными вели наблюдение в течение 21 дня. Все опытные животные оставались живыми, тогда как контрольные животные пали в течение 6-12 дней, что указывало на полное отсутствие вирулентности инактивированного вируса.

3.2.2. Определение антигенной активности радиоинактивированного вируса

Антигенную активность лиофилизированных проб инактивированного вируса исследовали в иммуоферментном анализе.

Анализ представленных данных показал, что наиболее выраженной антигенной активностью обладал вирус болезни Ауески, реплицированный на культуре клеток НГУК-1. Инактивация и лиофилизация не оказывали существенного влияния на антигенную активность вируса, что выразилось недостаточной разницей между титрами антигена до инактивации, до лиофилизации и после этих манипуляций.

3.2.3. Оценка влияния инактиваторов на антигенную активность вируса болезни Ауески

При оценке влияния инактиваторов на антигенную активность вируса болезни Ауески применяли неинактивированные вирусы, а также вирусосодержащие препараты, инактивированные формалином и ионизирующим излучением ^{60}Co .

При радиоинактивировании вируса болезни Ауески его антигенная активность сохранялась в титре, превышающем в 2,2 раза титр антигена вируса, полученного при инактивации формалином.

3.2.4. Определение иммуногенной активности радиоинактивированного антигена на белых крысах

Иммуногенность радиоинактивированного вакцинного вируса изучали в I серии опытов на белых крысах в сравнительных исследованиях с использованием живой вирусвакцины штамм "БУК-628" ВНИВИ при однократной иммунизации. Испытуемые антигены вводили подкожно, титры антител определяли в РВН и ИФА через 3, 7, 14 и 21 день после их введения.

Опыты показали, что антитела к вирусу болезни Ауески выявлялись в сыворотке крови у белых крыс, постепенно нарастая на 3 и 7 день после введения им инактивированной вирусвакцины.

Далее определяли иммуногенность вакцины на различных видах животных и при различных схемах применения.

Иммуногенность радиоинактивированной вакцинного вируса во II серии опытов изучали на белых крысах. Оценку проводили при двукратном применении инактивированной вакцины, которую вводили внутримышечно и подкожно с интервалом 2 недели, 1 месяц в дозе 50 мг/кг. Титр антител определяли в РВН, РНГА, ИФА через две недели после первой иммунизации и через 7, 14 дней после второй вакцинации.

До иммунизации животных антитела к вирусу болезни Ауески не обнаружены. Через 2 недели после первой иммунизации титр специфических антител в сыворотке крови белых крыс составлял в РВН $18,9 \pm 7,2$; в РНГА $20,8 \pm 4,1$; в ИФА $108,6 \pm 21,2$.

Таблица 1.- Титр специфических антител в сыворотке крови различных видов животных по вариантам опыта (РВН, РНГА, ИФА)

Методы исследования	Вид животных	Кол-во животных	До иммунизации	Через 2 недели после первой иммунизации	Через 7 суток после второй иммунизации (интервал 14 дней)	Через 7 суток после второй иммунизации (интервал 30 дней)	Через 14 суток после второй иммунизации (интервал 14 дней)	Через 14 суток после второй иммунизации (интервал 30 дней)
РВН	Белые крысы	45	-	18,9±7,2	32,7±5,3	30,8±4,4	42,9±4,6	37,3±2,4
	Кролики	9	-	22,4±2,4	38,6±3,1	32,4±2,9	49,2±3,0	44,8±2,4
	Овцы	8	-	30,7±3,7	62,9±3,8	51,4±2,4	64,4±3,2	58,5±2,9
РНГА	Белые крысы	45	-	20,8±4,1	33,6±4,3	31,2±2,4	46,7±2,4	42,4±3,1
	Кролики	9	-	24,5±2,4	39,7±3,7	31,4±2,1	48,7±2,4	44,5±2,6
	Овцы	8	-	32,6±3,4	63,9±6,4	57,5±2,3	65,3±2,1	63,6±2,7
ИФА	Белые крысы	45	-	108,4±21,2	196,8±24,9	167,4±22,8	234,9±21,2	185,9±21,4
	Кролики	9	-	114,9±17,9	199,4±26,0	184,6±21,4	221,8±20,1	192,7±19,9
	Овцы	8	-	124,8±17,2	209,9±26,4	198,4±17,2	246,9±21,3	216,8±17,4

Через 2 недели после второй иммунизации титр антител у белых крыс в реакции вируснейтрализации составлял в РВН: $42,9 \pm 4,6$; в РНГА: $46,7 \pm 2,4$; в ИФА: $234,9 \pm 21,2$. Результаты представлены в таблице 1.

3.2.5. Определение иммуногенной активности радиоинактивированного антигена на кроликах

Для дальнейшего изучения иммуногенной активности радиоинактивированной вакцины использовали кроликов. Инактивированную вакцину вводили внутримышечно и подкожно с интервалом 2 недели, 1 месяц в дозе 50 мг/кг в 2-кратной повторности. Титр антител определяли в РВН, РНГА, ИФА.

До иммунизации животных антитела к вирусу болезни Ауески не обнаружены. Через 2 недели после первой иммунизации титр специфических антител в сыворотке крови кроликов составлял в РВН $22,4 \pm 2,4$; в РНГА $24,5 \pm 2,4$; в ИФА $114,9 \pm 17,9$.

Через 2 недели после второй иммунизации титр антител у кроликов составлял в РВН: $49,2 \pm 3,0$; в РНГА: $48,7 \pm 2,4$; в ИФА: $221,8 \pm 20,1$ (таблица 1).

3.2.6. Определение иммуногенной активности радиоинактивированного антигена на овцах

Овцам антиген вводили внутримышечно и подкожно с интервалом 2 недели, 1 месяц в дозе 50 мг/кг в 2-кратной повторности. Титр антител определяли в РВН, РНГА, ИФА.

До иммунизации животных антитела к вирусу болезни Ауески не обнаружены. Через 2 недели после первой иммунизации титр специфических антител в сыворотке крови овец составлял в РВН $30,7 \pm 3,7$; в РНГА $32,6 \pm 3,4$; в ИФА $124,8 \pm 17,2$.

Через 2 недели после второй иммунизации титр антител у овец в РВН составлял: $64,4 \pm 3,2$; в РНГА: $68,3 \pm 2,1$; в ИФА: $246,9 \pm 21,3$.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что вирус болезни Ауески штамма "БУК-628" и "Производственный" после воздействия ионизирующего излучения ^{60}Co сохранял иммуногенные и антигенные свойства. Наибольшей активностью и чувствительностью к радиоинактивированному вирусу оказались овцы и кролики, что позволяет использовать их для изучения антигенной (иммуногенной) активности радиоинактивированной вакцины (таблица 1).

3.2.7. Подбор качественного иммуностимулятора для повышения иммуногенности радиоинактивированной вакцины против болезни Ауески

Для повышения иммуногенной активности инактивированной вакцины против болезни Ауески использовали известные средства различного класса: вакцинное масло, полный адьювант Фрейнда и ксимедон.

В опытах использовали белых крыс, овец и кроликов, разделенных на группы по видам изучаемых стимуляторов иммуногенеза. В качестве иммуногена применяли радиоинактивированную вакцину в дозе 30 мг/кг,

Таблица 2.- Титр специфических антител в сыворотке крови белых крыс, овец, кроликов иммунизированных инактивированной вакциной "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески (псевдобешенства) с различными адьювантами

Вид животного	Наименование препаратов	n	До иммунизации	Через 14 суток после первой иммунизации			Через 14 суток после второй иммунизации		
				РВН	РНГА	ИФА	РВН	РНГА	ИФА
Белые крысы	Инактивированная вакцина с вакцинным маслом	25	-	21,2±2,7	22,9±2,6	164,8±17,2	42,6±2,6	41,8±2,2	329,4±27,9
	Инактивированная вакцина с ПАФ	25	-	28,4±2,6	30,7±3,4	309±21,9	56,4±2,7	66,4±2,9	664,8±29,3
	Инактивированная вакцина с ксилмеломом	25	-	30,6±6,4	36,4±2,4	316,9±21,4	58,6±3,2	58,9±3,6	824,7±31,4
	Инактивированная вакцина без адьюванта (контроль)	25	-	18,9±7,2	20,8±4,1	108,6±21,2	42,9±4,6	46,7±2,4	234,9±21,2
кролики	Инактивированная вакцина с вакцинным маслом	4	-	29,3±2,9	31,6±2,4	186,9±19,7	66,7±2,6	59,8±1,7	342,9±26,2
	Инактивированная вакцина с ПАФ	4	-	39,5±2,6	47,5±2,9	312,6±21,7	91,9±2,4	96,8±2,0	768,9±27,9
	Инактивированная вакцина с ксилмеломом	4	-	43,7±2,9	49,6±2,7	326,6±26,4	94,6±2,9	98,9±2,9	884,4±24,3
	Инактивированная вакцина без адьюванта (контроль)	4	-	22,4±2,4	24,5±2,1	114,9±17,9	49,2±3,0	48,7±2,4	201,8±20,1
овцы	Инактивированная вакцина с вакцинным маслом	4	-	36,9±3,2	39,7±3,2	206,9±27,4	68,4±2,4	72,4±2,4	396,4±82,4
	Инактивированная вакцина с ПАФ	4	-	40,9±4,7	48,2±2,4	846,8±32,4	126,8±2,6	185,7±3,2	994,8±136,9
	Инактивированная вакцина с ксилмеломом	4	-	44,6±2,4	52,6±2,4	889,7±32,7	178,9±3,4	198,6±3,7	1094,8±146,7
	Инактивированная вакцина без адьюванта (контроль)	4	-	30,7±3,7	32,6±3,4	124,8±17,2	64,4±3,2	68,3±2,1	246,9±21,3

введение которой проводили совместно с иммуностропными препаратами в определенной дозе: ксимедон- 30мг/кг, ПАФ - белым крысам по 0,25 мл на голову, кроликам - 1,5 мл, овцам - 3 мл; вакцинное масло смешивали с прививочной дозой вакцины в соотношении 1:1 для всех испытуемых животных. Определение титров специфических антител проводили в РВН, РНГА и ИФА через 2 недели после I иммунизации и через 2 недели после II иммунизации опытных животных.

Специфические антитела к вирусу болезни Ауески были выявлены у белых крыс, иммунизированных инактивированным вакцинным препаратом с адьювантами в титрах, превышающих контрольные данные в РВН 1,4-1,6 раза, в РНГА - 1,4-1,8 раза и в ИФА 2,8-2,9 раза. Такая же закономерность наблюдалась и у овец. Результаты представлены в таблице 2.

Так, при однократной вакцинации кроликов с иммуностропными препаратами титр специфических антител у опытных животных превышали в РВН - в 2 раза, в РНГА - в 2 раза, в ИФА - в 2,9 раза.

В опытах отмечено существенное различие адьювантных свойств ксимедона и ПАФ на овцах по сравнению с вакцинным маслом. При этом титр антител в сыворотке крови овец, зарегистрированный в иммуноферментном анализе, превышал в 2,78 и 3,12 раза таковые, полученные при введении вакцины с вакцинным маслом. На белых крысах существенных различий не было выявлено.

3.2.8. Определение оптимальной дозы инактивированной вакцины

Для определения оптимальной дозы вводимого препарата белых крыс, кроликов и овец двукратно (с интервалом в 2 нед.) иммунизировали инактивированной γ -облучением вакциной против болезни Ауески с ксимедоном. Вакцину вводили в дозе 30, 50, 150 мг/кг.

Так, титры специфических антител после двукратного введения вакцины в дозе 50 мг/кг были достоверно выше ($P < 0,05$). Результаты представлены в таблице 3.

3.2.9. Определение способа введения инактивированной вакцины

Мы применяли два способа введения вакцины - подкожный и внутримышечный.

После однократной иммунизации белых крыс подкожной инъекцией вакцины титры антител в сыворотке крови крыс, выявленные в реакциях РВН, РНГА и ИФА, незначительно превышали показатели титров антител в сыворотке крови крыс, иммунизированных внутримышечно (в 1,2 раза, 1,4 и 1,2 раза соответственно). После второй иммунизации титр антител при подкожной инъекции был в РВН, РНГА и ИФА в 1,7 раза, 1,6 раза и 1,9 раза выше ($P < 0,05$), чем при внутримышечном введении. Такие же данные получены на кроликах и овцах. Результаты представлены в таблице 4.

3.2.10. Определение сроков реиммунизации

Ревакцинацию проводили крыс и овец с интервалами 14, 30, 60, 90 суток. В случае реиммунизации с интервалом 2 недели титры антител в

Таблица 3. -Титр специфических антител в сыворотке крови белых крыс, кроликов и овец в зависимости от дозы инактивированной вакцины против болезни Ауески

Вид животных	Доза вакцины мг/кг	До иммунизации	Через 2 недели после первой иммунизации			Через 2 недели после второй иммунизации		
			РВН	РНГА	ИФА	РВН	РНГА	ИФА
Белые крысы	30	-	5,4±1,7	6,7±2,0	56,4±11,9	14,8±1,4	15,4±1,7	101,8±19,4
	50	-	18,9±7,2	20,8±4,1	108,6±21,2	42,9±4,6	46,7±2,4	234,9±21,2
	150	-	6,9±2,4	8,2±1,1	71,2±17,2	12,8±2,4	13,2±1,4	119,4±17,2
Кролики	30	-	10,1±1,2	9,6±2,0	60,2±11,0	16,1±2,1	17,6±2,7	109,6±12,4
	50	-	22,4±2,4	24,5±2,1	114,9±17,9	49,2±3,0	48,7±2,4	221,8±20,1
	150	-	9,8±1,1	10,4±2,4	76,1±16,9	19,6±2,7	16,2±2,1	121,4±16,2
Овцы	30	-	12,6±2,4	12,6±2,4	61,4±14,2	28,6±2,4	30,1±2,3	126,9±14,7
	50	-	30,7±3,7	32,6±3,4	124,8±17,2	64,4±3,2	65,3±2,1	246,9±21,3
	150	-	27,6±1,4	19,4±2,1	74,9±14,6	32,2±2,1	34,1±1,1	124,5±13,5

Таблица 4. -Зависимость титра специфических антител в сыворотке крови белых крыс, кроликов и овец от способа введения вакцины по вариантам опыта

Виды животных	Способ введения вакцины	До иммунизации	Через 14 суток после первой иммунизации			Через 14 суток после второй иммунизации		
			РВН	РНГА	ИФА	РВН	РНГА	ИФА
Белые крысы	Внутримышечно	-	15,4±6,8	14,6±3,7	86,3±10,4	25,3±3,2	29,2±1,7	101,9±23,1
	Подкожно	-	18,9±7,2	20,8±4,1	108,6±21,2	42,9±4,6	46,7±2,4	234,9±21,2
Кролики	Внутримышечно	-	20,6±2,1	23,1±2,1	99,6±16,4	41,6±2,9	42,3±2,4	209,8±20,4
	Подкожно	-	22,4±2,4	24,5±2,4	114,9±17,9	49,2±3,0	48,7±2,4	221,8±20,1
Овцы	Внутримышечно	-	21,9±3,4	23,9±3,6	88,4±19,2	34,9±4,2	38,4±5,2	124,4±32,6
	Подкожно	-	30,7±3,7	32,6±3,4	124,8±17,2	62,9±3,8	63,9±6,4	209,9±26,4

Таблица 5 - Зависимость титра специфических антител в сыворотке крови белых крыс от сроков реиммунизации (РНГА)

Вид животных	Через 14 суток после первой иммунизации	Срок реиммунизации (сут.)	Время отбора проб сыворотки крови после реиммунизации (нед. и мес.)					
			2 нед.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.	6 мес.
Белые крысы	36,4±2,4	14	68,4±3,6	72,3±2,4	72,9±3,7	65,6±2,1	45,4±2,5	31,4±2,1
	33,5±2,7	30	48,6±2,4	51,3±1,7	49,4±1,9	41,4±2,4	30,9±2,1	21,2±1,4
	35,1±2,1	60	44,2±1,8	40,2±1,1	37,4±1,3	30,4±1,1	22,3±1,3	18,4±2,2
	35,8±2,3	90	40,8±1,1	36,8±1,3	32,3±1,1	28,4±1,4	20,7±1,1	18,4±1,2
Кролики	52,6±2,4	14	126,4±3,6	138,9±3,1	136,4±3,0	130,1±2,7	118,4±2,3	81,5±2,1
	51,2±2,3	30	104,8±2,0	108,6±2,7	112,4±2,1	110,5±2,4	84,5±1,9	72,6±1,3
	51,8±2,7	60	86,4±1,3	81,5±1,4	76,4±2,1	72,5±2,4	63,9±1,9	58,4±1,7
	50,4±2,1	90	82,9±1,7	73,7±1,9	69,5±2,0	64,5±2,7	62,1±1,1	49,1±1,2
Овцы	52,6±2,4	14	198,6±3,7	214,2±2,1	216,1±2,4	194,1±2,5	142,6±1,4	121,7±2,3
	51,2±2,3	30	68,3±2,1	69,3±2,4	68,2±3,7	69,3±3,1	62,4±2,4	60,1±2,1
	51,8±2,7	60	60,2±2,1	53,7±2,4	52,4±2,4	52,3±2,7	47,9±2,1	42,4±2,1
	50,4±2,1	90	61,4±2,0	52,4±2,1	50,3±2,2	48,9±2,3	43,4±1,7	37,1±1,8

сыворотке крови белых крыс, выявленные в РНГА через 1 месяц после иммунизации, превышали титры антител, выявленные у животных, иммунизированных с интервалом 30, 60 и 90 дней в 1,4 раза, 1,8 раза, 1,9 раза соответственно.

На кроликах и овцах получены аналогичные данные. Результаты представлены в таблице 5.

Наблюдение за иммунизированными животными вели в течение 6 месяцев (срок наблюдения).

На основании результатов исследований разработана инактивированная вакцина "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески, содержащая культуральный радиоинактивированный белок вируса болезни Ауески и высокомолекулярный водорастворимый иммуностимулятор ксимедон.

Показаны преимущества введения вакцины с иммуностимулятором, причем отмечено существенное преимущество ксимедона по совокупности свойств этого препарата, позволяющего увеличивать иммуногенность антигена в 2,8-3,5 раза, выявленную в ИФА. Установлено, что для повышения антигенной активности вакцины инъекции антигена с иммуностимулятором следует проводить подкожно в 2-кратной повторности с интервалом 2 недели в дозе 50 мг/кг.

3.2. Определение эффективности инактивированной вакцины на белых крысах

Для изучения эффективности инактивированной вакцины против болезни Ауески мы в своих исследованиях использовали белых крыс – как модель, генетически обусловленной чувствительностью к вирусу болезни Ауески.

Ведущим показателем эффективности вакцинации служит существенная защита экспериментальных животных от заражения их летальной дозой вирулентного штамма инфекционного агента.

Для этого опытных животных I-IV групп, иммунизированных радиоинактивированной вакциной в сочетании с ксимедоном (I группа), с полным адьювантом Фрейнда (II группа), с вакцинным маслом (III группа) и без иммуностимулятора (IV группа - контроль), а также интактных животных (V группа) на 21 день опыта заражали парентерально вирулентным вирусом штамма "Производственный" в летальной дозе $1 \cdot 10^4$ ЛД₁₀₀. Результаты исследований представлены на рис. 1.

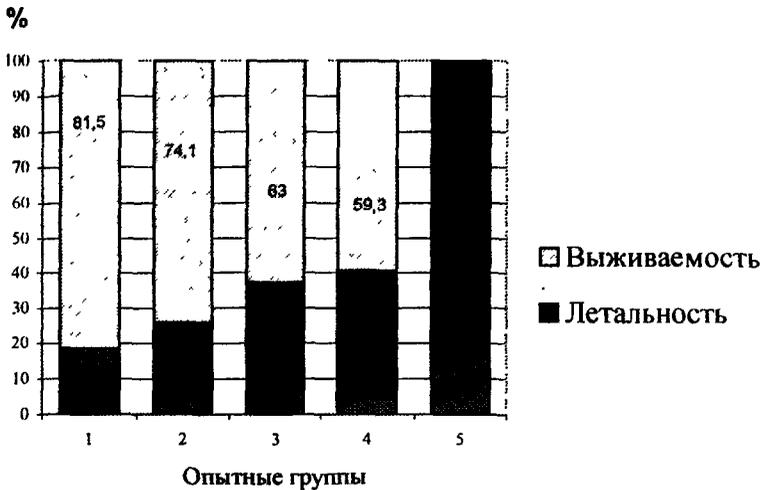
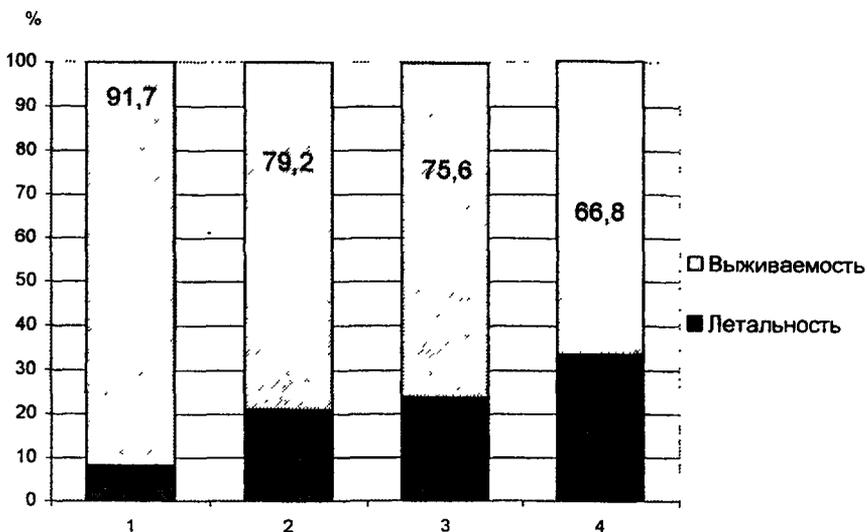


Рис.1. Влияние сочетанного применения инактивированной вакцины (ИнВ) с различными адьювантами на выживаемость привитых животных при последующем заражении их летальной дозой вируса болезни Ауески

Как показали наши исследования вакцинация радиоинактивированной моновакциной без адьюванта (IV группа - контрольная) защищала 59,3% вакцинированных животных. Летальность экспериментальных животных при применении ксимедона снижалась до 18,5%, при применении ПАФ – до 25,9%. Применение вакцинного масла существенного эффекта при защите животных не оказывало.

Радиоинактивированная вакцина против болезни Ауески была испытана также на опытных белых крысах с целью определения эффективности ее применения в зависимости от сроков реиммунизации.

Так, опытные белые крысы были реиммунизированы с интервалом 14 дней (I группа), 30 дней (II группа), 60 дней (III группа) и 90 дней (IV группа). После реиммунизации животные оставались в опыте под наблюдением в течение 6 месяцев (срок наблюдения), в процессе которого проводились иммунобиологические исследования в динамике. Через 6 месяцев их подвергали заражению вирусом болезни Ауески в летальной дозе. Результаты исследований представлены на рис. 2.



Опытные группы

Рис. 2. Влияние применения инактивированной вакцины (ИнВ) на выживаемость привитых животных в зависимости от сроков реиммунизации при последующем заражении их летальной дозой вируса болезни Ауески

Как видно из представленных данных вакцинация радиоинактивированной вакциной защищала животных в течение 6 месяцев (срок наблюдения) от заражения вирулентным вирусом болезни Ауески. При этом наиболее эффективной схемой применения вакцины оказалось двукратное ее введение животным и интервалом 14 и 30 дней. При этом процент защиты от вакцинации с интервалом 14 дней составил 91,7 %, с интервалом 30 дней достигал 79,2 % против 62,7% в контроле. Вакцинация с интервалом 60 и 90 дней по защите животных уступала по показателям двум другим схемам ее применения. Так, при этом процент защиты составил 75,6% и 66,8% соответственно.

На основании проведенных исследований показано, что ксимедон является наиболее перспективным иммуностимулятором, обладающим превосходными свойствами иммуностимуляции гуморальных факторов иммунитета, абсолютно не токсичным и не вызывающим побочных действий, позволяющим увеличить иммуногенность антигена в 2,8 раза

Наиболее эффективные показатели по защите животных получены при двукратной инъекции вакцины с иммуностимулятором при схеме иммунизации с интервалом 14 дней.

3.4. Изучение стабильности иммуногенных свойств вакцины в процессе хранения

Вакцину хранили в лиофилизированном виде при $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C , -80°C .

Антигенные и иммуногенные свойства радиоинaktivированной вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески определяли в РН, ИФА и на белых крысах через 6, 12, 18, 24 и 30 месяцев хранения (срок наблюдения).

Установлено, что титры антител в сыворотке крови крыс после их иммунизации радиоинaktivированной вакциной, хранившейся при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение указанных сроков, практически не изменялись. Аналогичные данные получены при хранении радиоинaktivированной вакцины при температуре минус 20°C и минус 80°C .

ВЫВОДЫ

1. Разработаны оптимальные условия культивирования вируса болезни Ауески штаммов "БУК-628" и "Производственный" на культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы "НГУК-1" в течение 18-30 часов с титром инфекционности 7,75 ТЦД_{50,1 мл} и 8,0 ТЦД_{50,1 мл} соответственно.

2. Определены оптимальные режимы инаktivирования инфекционности вируса болезни Ауески путем гамма - облучения вирусной биомассы на установке "Исследователь" с источником излучения ^{60}Co . Для изготовления вакцины был выбран режим облучения в дозе 25-30 кГр, которая полностью инаktivировывает вирулентность вирионов с сохранением их антигенности и иммуногенности.

3. Разработана технология изготовления радиоинaktivированной вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" против болезни Ауески, которая при контроле на белых крысах, кроликах и овцах оказалась безвредной, ареактогенной, обладающей высокой иммуногенной активностью, не имеющей аллергизирующих свойств и отвечающей требованиям ВТТ, предъявляемым к вакцинным препаратам.

4. Изучены иммунобиологические свойства вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" на лабораторных животных и овцах. Установлено, что вакцина стабильна, безвредна, авирулентна, не обладает реверсibilityностью. Показано, что при иммунизации животных вакциной из инаktivированного вируса антитела накапливались максимально на 14-й день после вакцинации (РВН-18,9; РНГА-20,8; ИФА-108,6). Ревакцинация животных радиоинaktivированной вакциной способствовала повышению титра антител в 2,2 раза (РВН-42,9; РНГА-46,7; ИФА-234,9)

5. При изготовлении радиоинaktivированной вакцины против болезни Ауески иммуномодулятор ксимедон, применявшийся из расчета 30 мг/кг

живой массы, проявляет иммуностимулирующие свойства. При этом иммуногенность вакцины повышается в 2,4 раза.

6. В лабораторных условиях установлено, что радиоинaktivированная вакцина против болезни Ауески, введенная крысам в дозе 1 ИД₅₀ (50 мг/кг), при контрольном заражении вирулентным вирусом БА штамм "Производственный" обеспечивает защиту от заболевания 79,7% крыс, а при ревакцинации – 91,7%.

7. Экспериментально установлено, что биологическая активность сухой вакцины в процессе хранения в течение 30 месяцев снижается незначительно, в среднем на 1:0,03, при температурном режиме хранения +4 °С, -20 °С, -80 °С.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать адаптированную к нейротропному вирусу болезни Ауески новую культуру клеток невриномы гассерова узла крысы, использовать для наработки вирусной биомассы и изготовления радиоинaktivированной вакцины против этой инфекции.

Для практической реализации полученных результатов разработаны следующие нормативно-технические документы:

- "Методические рекомендации по адаптации и культивированию вируса болезни Ауески на чувствительной культуре клеток невриномы гассерова узла крысы "НГУК-1", утвержденные директором ВНИВИ " 7 " сентября 2001 года;

- "Методические рекомендации по изготовлению и применению радиоинaktivированного антигена вируса болезни Ауески", утвержденные директором ВНИВИ " 19 " февраля 2002 года

- Результаты исследований применяются в учебной работе на кафедре эпизоотологии КГАВМ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ильясова Г.Х., Сафин М.А., Юсупов Р.Х., Гильмутдинов Р.Я., Матвеева Л.И., Кузнецова Е.А., Ильясова Г.Ф., Латфуллин Д.Н., Насыров Ш.М., Шарифуллин А.И. Адаптация вируса болезни Ауески (псевдобешенства) к клеткам невриномы гассерова узла крысы для биотехнологии вакцин и диагностикумов // Материалы международной практической конференции 30-31 мая 2001, ВНИИВВиМ – г.Покров,-2001,-С.158.

2. Сафин М.А., Латфуллин Д.Н., Шарифуллин А.И., Ильясова Г.Х. Ионизирующее излучение радиоактивного изотопа ⁶⁰Со для ветеринарной медицины // Материалы научно-производственной конференции по актуальным проблемам ветеринарии и зоотехнии.-Казань,-Ч.2.-С.179.

2003-А № 18967
20 18967

3. Латфуллин Д.Н., Насыров Ш.М., Ильясова Г.Х. Создание напряженного иммунитета с использованием ксимедона в составе инактивированной вакцины // Материалы международной конференции ветеринарных фармакологов и токсикологов, посвящ. 125-летию Н.А.Сохественского.-Казань,-2001.-С.74.

4. Ильясова Г.Ф., Цибульский А.П., Угрюмова В.С., Ильясова Г.Х., Конохов Г.В., Латфуллин Д.Н., Магсумов Р.З. Получение иммуногенной сухой культуральной инактивированной гамма-лучами вакцины "Гаммавак-ВНИВИ" против псевдобешенства (болезнь Ауески) // Вопросы вирусологии – 2003.-С.45.

5. Магсумов Р.З., Латфуллин Д.Н., Ильясова Г.Ф., Угрюмова В.С., Ильясова Г.Х. Контроль репродукции вируса болезни Ауески на различных клетках в МКА-ИФА тесте // Всероссийская юбилейная научно-практическая конференция посвящ. 75-летию образования НИИ микробиологии МО РФ / Актуальные проблемы микробиологической безопасности РФ. - Киров-2003. –С.67.

Подписано к печати 12.11.03

Заказ 149 Тираж 100 экз.

Бумага офсетная

Формат 60x84/16

Усл.-печ. л. 1,0

Печать RISO

Центр информационных технологий КГАВМ
420074, Казань, Сибирский тракт, 35.