На правах рукописи

КЛЮКИНА Надежда Дмитриевна

ПОЛИАКРИЛОВАЯ КИСЛОТА КАК АДЪЮВАНТ В ПРОТИВОЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЕ

16.00.03 «Ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Владимир – 2007

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир

Научный руководитель - доктор ветеринарных наук, профессор
МИХАЛИШИН Валерий Васильевич

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
РУСАЛЕЕВ Владимир Сергеевич
(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г Владимир),
доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
БАЛЫШЕВ Владимир Михайлович
(ГНУ ВНИИВВиМ, г Покров)

Ведущая организация: ФГУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств и кормов для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ», г Москва)

Защита состоится 5 июня 2007 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220 015 01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу 600901, г Владимир, мкр Юрьевец

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Автореферат разослан 4 мая 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник Г М Семенова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы Ящур имеет широкое распространение в ряде стран мира Международный опыт профилактики ящура показывает, что осуществление только ветеринарно-санитарных мер не гарантирует защиту от распространения заболевания Так, появление ящура паназиатского штамма О в 1997 г на Тайване и дальнейшее его распространение в Южной Корее, Японии (2000г), Великобритании, Франции и Нидерландах (2001г) показывает, что ликвидация болезни с использованием метода убоя (уничтожения) зараженных стад дает положительные результаты в том случае, если источник ограничен и обеспечена ранняя диагностика При запоздалой диагностике в Великобритании и Тайване было уничтожено по 4 млн животных (А И Дудников и др , 2004)

В 2001-2003 гг заболевание животных ящуром регистрировали в 71 стране мира, в том числе в 31 азиатской, 25 африканских, 8 южноамериканских и в 7 европейских государствах Были идентифицированы все 7 известных типов вируса ящура, но преобладающими являлись типы О и А (В М Захаров, А М Рахманов, 2003)

В комплексе мер борьбы с ящуром основное место отводится вакцинации, которая обеспечивает иммунитет в популяции восприимчивых животных (В И Еремец и др , 1987)

Считается, что лучшими вакцинами для крупного и мелкого рогатого скота являются сорбированные вакцины с сапонином, однако они неэффективны для вакцинации свиней (А И Дудников, 1990) Наиболее эффективными для свиней являются эмульсионные вакцины, они также могут быть эффективными для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота Эмульсионные вакцины типа «вода-масло» при иммунизации крупного и мелкого рогатого скота часто дают тяжелые изменения в местах введения вакцин, а при многократном применении аллергические реакции Н С Мамков (1999) установил, что причиной появления нежелательных реакций у животных

являются качество и свойства масляных адъювантов Исследованиями ряда авторов было показано, что выраженным адъювантным действием при изготовлении различных вакцин обладают различные полиэлектролиты (Р В Петров и др , 1981, 1983, 1986)

Р В Петров и Р М Хаитов (1983) отметили свойство высокомолекулярных соединений – полианионов и поликатионов стимулировать иммунный ответ у животных Такие адъюванты индуцируют Т-независимый ответ и позволяют обойти генетический контроль иммунного ответа Такая фенотипическая коррекция обеспечивает высокий уровень ответа даже у низкореагирующих особей

Д В Михалишин (2000) применял полиакриловую кислоту (ПАК) как адъювант в составе сорбированной противоящурной вакцины и показал, что ПАК усиливает иммунный ответ и является эффективным в качестве адъюванта при производстве противоящурных вакцин для иммунизации крупного рогатого скота (КРС) Однако при этом не были проведены исследования иммуногенной активности вакцин с ПАК на свиньях Также не изучалась иммуногенность вакцин с сополимерами ПАК на сельскохозяйственных животных

Во многих исследованиях было отмечено, что противоящурные вакцины, особенно эмульсионные, требуют новых методов очистки, концентрирования, инактивации и подбора адъювантов Стремление создать высокоочищенные антигены приводит к необходимости использовать различные методы очистки (как химические, так и физические)

Перечисленные вопросы требуют своего разрешения и стали основой наших исследований

Цель и задачи исследования. Главной целью наших исследований был поиск новых адъювантов из группы синтетических полиэлектролитов, использование их при производстве противоящурных вакцин и изучение

свойств вакцин с этими адъювантами в лабораторных условиях на крупном рогатом скоте и свиньях Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи

– провести отбор и оценку адъювантов из группы синтетических полиэлектролитов для применения в противоящурных вакцинах,

– изучить токсические свойства полиакриловой кислоты и сополимеров полиакриловой кислоты и поливинилпирролидона,

– изучить адъювантные свойства полиакриловой кислоты в зависимости от ее молекулярной массы и сополимеров полиакриловой кислоты и поливинилпирролидона,

– получить экспериментальные образцы противоящурных вакцин с полиакриловой кислотой и проверить иммуногенность вакцин с синтетическими полиэлектролитами в качестве адъювантов в лабораторных условиях;

– оптимизировать условия концентрирования вируса ящура методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или ее сополимеров,

– проверить иммуногенность противоящурных вакцин, приготовленных из концентратов, полученных методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или сополимеров полиакриловой кислоты,

– изучить сохранность концентратов вируса ящура, полученных методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или сополимеров полиакриловой кислоты

Научная новизна. Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований

– определены токсические дозы полиакриловой кислоты и сополимеров полиакриловой кислоты и поливинилпирролидона,

– доказана пригодность полиакриловой кислоты и ее сополимеров как стимуляторов иммунитета в противоящурных вакцинах для лабораторных животных, крупного рогатого скота и свиней,

– разработан новый эффективный метод концентрирования антигена вируса ящура с помощью полиакриловой кислоты или ее сополимеров, пригодный для изготовления инактивированных вакцин

Практическое значение работы На основании проведенных исследований разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «Федеральный центр охраны защиты животных» «Методические рекомендации по получению высокоочищенных концентратов вируссодержащего материала для изготовления противоящурных вакцин и диагностикумов» (2007г) Материалы научных исследований вошли в подготовленный проект НД на противоящурную вакцину с полиакриловой кислотой в качестве адъюванта, который одобрен ученым советом и утвержден директором ФГУ «Федеральный центр охраны защиты животных» (2007г)

Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту:

– токсические свойства полиакриловой кислоты в зависимости от ее молекулярной массы и сополимеров полиакриловой кислоты и поливинилпирролидона,

– адъювантные свойства полиакриловой кислоты в зависимости от ее молекулярной массы и сополимеров полиакриловой кислоты и поливинилпирролидона,

– иммуногенная активность противоящурных вакцин с синтетическими полиэлектролитами в качестве адъювантов,

– оптимизация условий концентрирования культурального вируса ящура методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или ее сополимеров,

– иммуногенность вакцин, приготовленных из концентратов вируса ящура, полученных методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или сополимеров полиакриловой кислоты;

– сохраняемость концентратов вируссодержащих материалов, полученных методом «сорбции-элюции» при помощи полиакриловой кислоты или сополимеров полиакриловой кислоты

Апробация результатов работы. Результаты исследований по теме диссертации доложены и опубликованы в материалах Международной научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» (г Владимир, 2003) и на заседаниях ученого совета Федерального государственного учреждения «Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ») в 2002-2005 годах

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 3 – в журнале «Ветеринарная патология» по перечню ВАК РФ

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, содержит 29 таблиц и рисунок Список использованной литературы включает 204 наименований, из них 101 отечественных и 103 зарубежных В трех приложениях представлены документы, подтверждающие достоверность результатов работы, ее научную и практическую значимость

Выражаю благодарность научному руководителю доктору ветеринарных наук, профессору Михалишину Валерию Васильевичу за помощь при выполнении работы и ее оформлении, а также сотрудникам лаборатории биотехнологии за помощь при выполнении отдельных этапов работы и оформлении диссертации

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Вирусы. Экспериментальную работу проводили с использованием следующих типов и штаммов вируса ящура

- культуральные штаммы. A_{22} №550, O_1 №194, C_1 №564, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 Шамир 3/89, Азия-1 №1737/Грузия/2000, О №1734/Приморский/2000, А № 1707/Армения/98, репродуцированные в суспензии клеток ВНК-21/2-17, 5-6 пассажа каждый

- индикаторные адаптированные к белым мышам штаммы A_{22} №550 (пассаж 192) и O_1 №194 (пассаж 194), адаптированные к морским свинкам штаммы A_{22} №550 и Азия-1 Иран 58/99, адаптированные к свиньям штаммы О №1734/Приморский/2000, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1737/Грузия/2000, А № 1707 Армения/98,

- афтозные штаммы C_1 №564, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 №1737/Грузия/2000 (для КРС)

2.1.2. Животные. Для экспериментов использовали лабораторных (морских свинок, массой 0,4-0,5 кг, белых мышей, массой 18-20г) и естественно восприимчивых животных из благополучных по ящуру зон подсвинков, массой 30-80 кг, КРС, массой 150-300 кг

2.1.3. Культуры клеток. Исследования по теме диссертации выполнены с использованием производственной линии клеток ВНК-21/2-17 и первично-трипсинизированной культуры клеток почки свиньи (СП)

2.1.4. Адъюванты. При приготовлении инактивированных вакцин были использованы в качестве адъювантов

- полиакриловая кислота различной молекулярной массы ПАК Мм $0,16\times10^6$Д, ПАК Мм $0,22\times10^6$Д, ПАК Мм $0,36\times10^6$Д, ПАК Мм $0,8\times10^6$Д, ПАК Мм $1,0\times10^6$Д, сополимеры полиакриловой кислоты ПАК ПВПД 25 75 состава (%, мольн), образцы № 2 и 4, ПАК ПВПД 50 50 состава (%, мольн), образцы № 1 и 3

- гидроокись алюминия (ГОА), 3% концентрации, производство ФГУ «ВНИИЗЖ»,

- сапонин фирмы «Мерк», Германия,

- масляный адъювант ISA-70 фирмы «Сеппик», Франция

2.1.5. Растворы и реактивы. Все растворы готовили на бидистилированной воде согласно ГОСТу 6709 В работе использовали следующие растворы фосфатно-буферный раствор (ФБР) 1/15М, pH 7,2-7,8, ФБР 1/3М, pH 7,2-7,8, забуференный изотонический раствор NaCl В работе также использовали раствор Хенкса, pH 7,4-7,6, питательные среды Игла, 0,4% раствор ГЛА на Эрла, 40%-ный раствор NaOH, аммиак водный х ч , ГОСТ 3760-77, 18-26%-ный раствор аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ), хлороформ, ГОСТ 20015-74 или ТУ 6-09-4263-76, полисепт (полигексаметиленгуанидин (МЦ)), производство ПЗБ, г Покров

2.1.6. Определение токсичности. Исследование токсичности проводили на белых мышах Для этого было составлено 9 групп по 20 белых мышей в каждой ПАК и ее сополимеры разводили ФБР до концентрации 0,25%, 0,5%, 1%, 2% и 4% Данные разведения инъецировали подкожно по 0,5 мл На каждую концентрацию брали по 4 белых мыши В дальнейшем в течение 10 дней вели наблюдение за животными, токсическую дозу рассчитывали по количеству погибших белых мышей Расчет проводили по формуле

$$\lg \text{Им}Д_{50} = \lg Д - \delta\,(\Sigma\, L_1 - 0{,}5),$$ где

lg Д - логарифм дозы препарата,

δ – логарифм кратности разведения вакцины,

Σ L1 – сумма отношений числа погибших животных к общему числу животных по каждой группе

2.1.7. Очистка вирусной суспензии. Вируссодержащую суспензию культурального вируса ящура (КВЯ) очищали с помощью 0,2% раствора хлороформа с внесением полигексаметиленгуанидина в конечной концентрации 0,007% и последующим центрифугированием

2.1.8. Определение титра инфекционности вируса. Титрование КВЯ проводили по методу Дульбекко и Фогта в модификации С Н Давыдовой и Н А Перевозчиковой (1990)

2.1.9. Инактивация вируса ящура. Вирус в суспензии инактивировали водным раствором АЭЭИ 15-25% концентрации Рабочий

раствор АЭЭИ подкисляли раствором уксусной кислоты до pH 7,8-8,3 После окончания культивирования в вируссодержащую суспензию вносили хлороформ до 0,2% и раствор АЭЭИ до концентрации 0,05%, перемешивали и переливали в другую стерильную емкость Инактивацию проводили при 37^{0}С в течение 12 часов, затем суспензию охлаждали

2.1.10. Определение авирулентности препаратов. Авирулентность инактивированных препаратов культурального вируса определяли на культуре клеток почки свиньи

2.1.11. Концентрирование антигена. Концентрирование антигена осуществляли ультрафильтрацией и сорбцией на ГОА с последующей элюцией антигена

2.1.12. Количественное определение вирусного белка. Определение количества 146S+75S компонента определяли иммунохимическим методом по А Ф Бондаренко (1980)

2.1.13. Реакция нейтрализации. Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) использовали реакцию нейтрализации (РН) Постановку РН осуществляли в культуре клеток СП с постоянной дозой вируса соответствующего штамма (100 $ТЦД_{50}$)

2.1.14. Изготовление сорбированных вакцин. Лабораторные образцы вакцины готовили из 10-20 кратных концентратов антигена вируса ящура таким образом, чтобы в прививной дозе содержалось не менее 6 мкг 146S+75S компонентов и последующим внесением ГОА и сапонина в качестве адъювантов с целью контроля их иммуногенной активности Бивалентные вакцины компоновали согласно количеству 146S+75S компонента При этом в прививной дозе должно содержаться, не менее 6 мкг 146S+75S компонента каждого типа Затем добавляли ГОА до 40% к объему Сапонин вносили до конечной концентрации 1,5 мг в дозе для КРС

2.1.15. Изготовление эмульсионных вакцин. Эмульсионные вакцины готовили, смешивая 60% масляного адъюванта с 40% суспензии антигена вируса ящура, при этом смесь эмульгировали в гомогенизаторе РТ-2

2.1.16. Контроль иммуногенности вакцин. При определении иммуногенности вакцин на крупном рогатом скоте руководствовались ТУ 9384-

007-00495527-2000 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)», на свиньях - ТУ 9384-008-00495527-99 «Вакцина против ящура эмульсионная моно- и поливалентная для профилактики ящура свиней (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)» Через 19-21 суток после вакцинации привитых и контрольных животных заражали в две точки в дозе 10^4 $ИД_{50}$/0,2 мл афтозного вируса ящура соответствующего типа, адаптированного к КРС или к свиньям Наблюдение вели в течение 7 суток с момента заражения, затем животных убивали и проводили патологоанатомическое исследование Защищенными от ящура считали животных без генерализации процесса, т е не имеющих афтозных поражений на конечностях

2.1.17. Определение стерильности антигена вирус ящура. Данные исследования проводили согласно ГОСТу 280085-89 «Препараты биологические Методы бактериологического контроля стерильности»

2.1.18. Определение реактогенности препаратов. В подушечку задней правой лапы, 10 мышам, массой 18-20г вводили ПАК в объеме 0,05 мл, а в подушечку левой задней лапы вводили изотонический раствор NaCl в том же объеме (контроль) Через 10 дней животных усыпляли, ампутировали задние лапки по голеностопному суставу и взвешивали на торзионных весах Критерием оценки реактогенности служил процент отека опытных лап, который рассчитывали по формуле

$$\frac{X_0 - X_k}{X_k} \times 100\%, \text{ где}$$

X_0 и X_K - среднее арифметическое массы опытных и контрольных лап Исходя из полученных величин процент отека опытных лап, после введения ПАК, препараты расценивали как слабо реактогенные, если процент отека не превышал 24%, умеренно реактогенными от – 25 до 49%, выражено реактогенными – от 50 до 99%

2.1.19. Статистическая обработка результатов исследований. Для обработки результатов исследований использовали статистические методы, предложенные Кербером и модифицированные И П Ашмариным и А А Воробьевым (1962)

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение токсических свойств ПАК и ее сополимеров. Токсические свойства ПАК и ее сополимеров исследовали в культуре клеток СП и на белых мышах Для этого на монослой культуры клеток СП наносили питательную среду, содержащую 0,01, 0,05, 0,1 0,15, 0,2, 0,25, 0,3 0,35, 0,4, 0,45, 0,5% концентрации ПАК и 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9 1,0, 1,1, 1,2 1,3, 1,4, 1,5% сополимеров ПАК Учет производили через 48 часов инкубации при 37^0С, оценивая состояние монослоя Токсичность проявлялась округлением клеток, которое заканчивалось нарушением целостности монослоя

При выполнении исследований выявлено, что растворы ПАК являлись более токсичными, чем растворы сополимеров При этом в опытах, которые были проведены на белых мышах, $ТД_{50}$ у ПАК составила 26,7-44,1мг/кг, а у сополимеров более 200 мг/кг Исследование токсичности в культуре клеток СП показало, что ПАК вызывала округление клеток и нарушение целостности монослоя при концентрациях 2-4 мг/мл, а для сополимеров ПАК и ПВПД – 10-15 мг/мл

При определении реактогенных свойств было установлено, что ПАК в противоящурных вакцинах, не обладает раздражающим действием на ткани лабораторных животных, КРС и свиней

Изучение адъювантной активности ПАК и ее сополимеров на лабораторных животных. Определение адъювантной активности ПАК и ее сополимеров проводили на взрослых белых мышах массой 18-20г, используя производственный вирус ящура типов $А_{22}$ №550 и $О_1$ №194 и гомологичные индикаторные вирусы, адаптированные к белым мышам

Опытные и контрольные вакцины содержали равное количество иммуногенных компонентов вируса В опытные вакцины добавляли ПАК и сополимеры до концентрации равной 0,1 мг в 0,5 мл При этом мышам вводили адъювант в дозе 5,0-5,5 мг/кг. Опытные вакцины разводили растворами соответствующих адъювантов В качестве контроля использовали эту же вакцину без добавления адъюванта, разведение контрольной вакцины осуществляли ФБР

Приготовленными образцами иммунизировали мышей в дозе 0,5 мл подкожно Вакцинированных животных заражали вирусом гомологичного типа, адаптированного к белым мышам, через 21 день после вакцинации, в дозе 10^4 $ЛД_{50}$/мл Через 7 дней учитывали окончательный результат и рассчитывали $ИмД_{50}$ по методу Кербера в модификации Ашмарина Результаты опытов обобщены в таблице 1

Таблица 1

Изучение адъювантной активности ПАК и сополимеров

n=4

№ п/п	Адъювант	$ИмД_{50}$М (мл) тип $А_{22}$ №550	$ИмД_{50}$М (мл) тип $О_1$ №194
1	ПАК Мм 160000Д	0,05±0,01 p<0,05	0,04±0,007 p<0,05
2	ПАК Мм 220000Д	0,04±0,007 p<0,05	0,04±0,006 p<0,025
3	ПАК Мм 360000Д	0,04±0,005 p<0,025	0,05±0,012 p<0,05
4	ПАК Мм 800000Д	0,04±0,001 p<0,05	0,04±0,006 p<0,025
5	ПАК Мм 1000000Д	0,04±0,007 p<0,025	0,05±0,012 p<0,05
6	ПАК ПВПД 25 75(%, мольн) образец №2	0,03±0,003 p<0,025	0,04±0,007 p<0,05
7	ПАК ПВПД 25 75(%, мольн) образец №4	0,04±0,006 p<0,025	0,04±0,009 p<0,05
8	ПАК ПВПД 50 50(%, мольн) образец №3	0,04±0,001 p<0,05	0,05±0,009 p<0,05
9	ПАК ПВПД 50 50(%, мольн) образец №1	0,04±0,007 p<0,05	0,05±0,001 p<0,05
10	контроль	0,09±0,027 p<0,05	0,11±0,002 p<0,05

Наличие ПАК и сополимеров в качестве адъювантов в опытных вакцинах усиливало иммунный ответ у мышей в сравнении с контрольной вакциной в 2 раза По вирусу ящура типа А $ИмД_{50}$М опытных вакцин составили 0,03-0,05мл, по типу О – 0,04-0,05 мл, при этом контрольные вакцины имели $ИмД_{50}$М равную 0,09 и 0,11мл, соответственно

Изучение иммуногенной активности вакцин с синтетическими адъювантами. Учитывая, что растворы ПАК свыше 3% концентрации, обладают высокой вязкостью и трудно вводятся, в наших исследованиях применяли растворы ПАК не выше 3% концентрации

Экспериментальные вакцины готовили следующим образом вначале проводили инактивацию вируса АЭЭИ и очистку антигена с помощью 0,2% хлороформа и добавления полигексаметиленгуанидина до концентрации 0,005%, затем проводили концентрирование антигена ультрафильтрацией или адсорбцией на ГОА и добавляли в качестве адъювантов ПАК или сополимеров ПАК и ПВПД до концентраций 3% (60 мг в прививной дозе)

Изучение иммуногенной активности вакцин с ПАК на крупном рогатом скоте. Исследование проводили на КРС с живой массой 150-200 кг Животным вводили адъювант в количестве 0,3-0,4 мг/кг В качестве контрольной вакцины использовали адсорбат вакцину, содержащую ГОА и сапонин На 10 и 21 дни после вакцинации отбирали пробы крови Сыворотки крови исследовали в РН в монослойной культуре клеток СП Контрольное заражение животных проводили на 21 день после вакцинации афтозным вирусом ящура типа Азия-1 Иран 58/99 в дозе 10^4 $ИД_{50}$ в объеме 0,2 мл в две точки слизистой оболочки языка Патологоанатомический осмотр проводили через 7 суток Результаты представлены в таблице 2

Таблица 2

Иммуногенность моновалентной противоящурной вакцины типа Азия-1 Иран 58/99 с ПАК в качестве адъюванта

№ животных	Характеристика вакцины	Прививная доза (мл)	Титр ВНА ($\log_2$)		Результаты контрольного заражения	
			10 дпв	21 дпв	Первич	Генерал
1	6мкг 146S+75S+60мг ПАК	2,0	4,50	7,50	-	-
2			4,25	7,25	-	-
3			4,00	6,75	+	-
M±m			4,33±0,28 p<0,001	7,17±0,22 p<0,001		
4	6мкг46S+75S +30мг ГОА+1,5мг сапонин (контроль)	2,0	2,25	6,25	+	-
5			3,00	6,75	+	-
M±m			2,88±0,16	6,50±0,25		
6 контроль вируса	-	-	-	-	+	+

Примечание + положительный результат
- отрицательный результат

Из данных таблицы 2 видно, что моновалентная вакцина типа Азия-1 с адъювантом ПАК индуцировала напряженный иммунитет у КРС Уровень ВНА у животных, привитых вакциной с ПАК, на 10ДПВ был выше в 1,5 раза, а на 21 ДПВ в 1,1 раза, чем у животных, привитых контрольной вакциной

Изучение иммуногенной активности вакцин с ПАК на свиньях. Работу по изучению иммуногенной активности вакцин с ПАК и синтетическими адъювантами на свиньях проводили с использованием концентрированных антигенов вируса ящура А №1707/Армения/98 и Азия-1 Иран 58/99 Вакцины содержали 4 мкг 146S+75S компонентов и 60 мг ПАК в прививной дозе 2 мл Контрольное заражение показало, что из 10 вакцинированных подсвинков не было защищено ни одно животное

При увеличении количества антигена в дозе до 6 мкг и адъюванта ПАК до 90 мг в прививной дозе 3 мл, эффективность испытанной вакцины также не отвечала требованиям, предъявляемым к профилактическим препаратам Прививная доза содержала 4,6 $ПД_{50}$

Таким образом, прививноя доза 2-3 мл недостаточна для эффективной иммунизации свиней вакциной с ПАК в качестве адъюванта

В дальнейшем было увеличено количество адъюванта ПАК до 150 мг, а количество антигена вируса ящура в дозе было 6 мкг. Исследование проводили на 15 подсвинках с живой массой 50-80 кг Цельной вакциной и разведением 1 10 вакцинировали подсвинков внутримышечно по 5 мл Гуморальный иммунитет исследовали на 9 и 21 дни после вакцинации Контрольное заражение проводили на 21 день после вакцинации путем введения афтозного вируса ящура типа О №1734/Приморский/2000 в дозе 10^4 $ИД_{50}$ в две точки слизистой оболочки языка Патологоанатомический осмотр производили через 7 суток Установлено, что на 9 день после иммунизации вакцина индуцировала у подсвинков в 1,5 раза больше количество ВНА (5,17±0,37 $\log_2$) по сравнению с количеством антител (3,39±0,88 $\log_2$) у подсвинков, привитых вакциной в разведении 1 10 На 21 день после вакцинации наблюдали снижение уровня ВНА в крови подсвинков, привитых как цельной вакциной, так и ее разведением 1 10. В прививной дозе вакцины содержалось 8 $ПД_{50}$ Результаты опыта суммированы в таблице 3

Таблица 3

Иммуногенная активность вакцины типа О №1734/Приморский/2000 с ПАК для свиней

Хар-ка вакцины	Разведение вакцины	Прививная доза (мл)	Титр ВНА (log_2)		Результаты контрольного заражения	
			9ДПВ	21ДПВ	Первич	Генерал
6мкг 146S+75S +150мг ПАК	цельная	5	4,50	2,00	+	+
			3,75	2,50	+	-
			5,50	3,00	+	-
			6,25	4,25	+	-
			5,75	5,25	-	-
			5,25	4,25	+	-
			5,17±0,37 p<0,001	3,54±0,51 p<0,001		
0,6мкг 146S+75S +150мг ПАК	1 10	5	6,75	5,00	-	-
			4,00	4,25	+	-
			2,75	3,00	+	-
			1,00	1,00	+	+
			0,75	0,50	+	+
			2,50	2,25	+	+
			6,00	4,25	+	-
			3,39±0,88 p<0,01	2,93±0,67 p<0,005		
контроль	-	-	-	-	+	+
	-	-	-	-	+	+

Примечание + положительный результат
- отрицательный результат

Отработка условий концентрирования вируса ящура с помощью метода «сорбции-элюции»

В дальнейших исследованиях были приготовлены концентраты вируса ящура с помощью метода «сорбции-элюции» При этом была определена оптимальная концентрация ГОА при проведении сорбции и отработана техника элюции В опытах были испытаны следующие концентрации ГОА 0,10, 0,15, 0,175, 0,20, 0,225, 0,25; 0,30% Опыты проводили с культуральным вирусом типов A_{22} №550, O_1 №194, C_1 №564, Азия-1 Иран 58/99, репродуцированным в суспензии клеток ВНК-21/2-17 Суспензию КВЯ очищали добавлением 0,005% полигексаметиленгуанидина в присутствии 0,2% хлороформа и затем

центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут. В очищенную вируссодержащую суспензию добавляли ГОА в указанных концентрациях, шуттелировали в течение 30 мин и выдерживали при 2-8^{0}С в течение 12-18 часов Затем центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость В надосадочной жидкости определяли инфекционность вируса и количество вирусного белка В качестве контроля использовали исходную суспензию после очистки Установлено, что при использовании для сорбции ГОА в концентрации 0,20% потери общего вирусного белка (ОВБ) составляли 1% При использовании 0,30% концентрации ГОА для сорбции потери были значительно меньше (0,1-0,2%) С надосадочной жидкостью удаляется от 82 до 84% растворенного белка без потери иммуногенных компонентов вируса Это приводит к улучшению качества вакцин и уменьшению побочных реакций при ее введении

Отработка техники элюции. В опытах использовали вакцинные штаммы вируса ящура типов. A_{22} №550, O_1 №194, C_1 №564, Азия-1 Иран 58/99 Элюирование проводили по методу Matheka, который основан на применении 1/3 М ФБР для проведения элюции Для промывания осадка использовали забуференный изотонический раствор NaCl Перед элюированием антигена раствором ПАК для промывания осадка предварительно использовали стерильную дистиллированную воду Для исследований использовали ГОА в концентрациях 0,20% и 0,30% После удаления промывочной жидкость в ней определяли количество растворенных белков и ОВБ Балластных белков при промывании было удалено от 27,3 до 32,0 мг%, а количество ОВБ от 0 до 0,10 мкг/мл В последующих опытах испытаны эффективные концентрации полиэлектролитов, обеспечивающие элюцию КВЯ с ГОА Были испытаны концентрации ПАК Мм $0{,}8\times10^6$ от 0,01 до 1,0 %. Установлено, что при элюировании антигена с ГОА 0,5%-ыми растворами ПАК различной М м потери были меньше, чем при использовании 0,25 и 1,0% концентрации

В дальнейших исследованиях для элюции вируса ящура использовали растворы ПАК и сополимеров 0,5 % концентрации Отработку условий

элюирования продолжили с инактивированным вирусом ящура типа O_1 №194 В качестве контроля процесса мы использовали 1/3М ФБР и условия для элюирования, предложенные Matheka (1959) Результаты показали, что элюция вируса при помощи 0,5% раствора ПАК и 1/3М ФБР приводит к одинаковым потерям антигена

Концентрирование вируса ящура методом «сорбции-элюции» для изготовления вакцин

После адсорбции инактивированного вируса на ГОА проводили промывку осадка К полученному осадку добавляли 0,5%-ный раствор ПАК Мм $0,8\times10^6$ на ФБР Готовили 10-ти кратные концентраты, которые в дальнейшем разбавляли до исходного объема и сравнивали с исходным антигеном Работу проводили с инактивированным вирусом ящура типов A_{22} №550, O_1 №194, Азия-1 Иран 58/99, Азия-1 Шамир 3/89 Перед определением компонентного состава концентраты разводили ФБР в 10 раз Иммуногенную активность определяли в составе сорбированных вакцин на белых мышах и морских свинках Вакцины готовили, смешивая концентрированные антигены 1 1 с 3% ГОА Контролем служили вакцины, приготовленные из антигенов до концентрирования Результаты представлены в таблице 4

Таблица 4

Изучение эффективности концентрирования антигенов с помощью метода «сорбции-элюции»

Тип антигена	Кратность концентрирования	Кол-во компонентов ОВБ/146S+75S (мкг/мл)	Потери в % ОВБ/146S +75S	$ИмД_{50}$ М (мл)	$ИмД_{50}$ МС (мл)
Азия-1 Иран 58/99	10	1,91/1,39	2/4,2	-	0,04
	0 (исходная)	1,94/1,45	-	-	0,04
Азия-1 Шамир 3/89	10	0,87/0,80	30,2/29,3	-	0,08
	0 (исходная)	1,43/1,13	-	-	0,05
O_1 №194	10	1,42/1,25	28,2/22,8	0,08	-
	0 (исходная)	1,95/1,62	-	0,06	-
A_{22} №550	10	1,77/1,49	18,7/26,2	0,06	-
	0 (исходная)	2,16/2,02	-	0,04	-

Результаты опытов, представленных в таблице 4, показали, что при концентрировании антигенов вируса ящура типа Азия-1 процент потерь общего вирусного белка составил от 2 до 30,2%, а 146S+75S компонентов от 4,2 до 29,3% по отношению к исходной суспензии Иммуногенность сорбированных вакцин для морских свинок из антигена вируса ящура Азия-1 была в пределах 0,04-0,08 мл

Потери при концентрировании методом «сорбции-элюции» антигенов вируса ящура типа O_1 №194 и типа A_{22} №550, составили по ОВБ – 28,2 и 18,1%, по 146S+75S компонентам – 22,8 и 26,2% Иммуногенная активность вакцин из антигена типа O_1 №194 была 0,06-0,08 мл, из антигена типа A_{22} №550 – 0,04-0,06 мл при контроле на белых мышах

В следующих опытах аналогичную работу провели с сополимерами ПАК №1 и №4 Антигены вируса ящура типов A_{22} №550, O_1 №194, Азия-1 Иран 58/99 концентрировали в 10 раз методом «сорбции-элюции» В полученных концентратах определяли количество ОВБ и 146S+75S компонентов, предварительно разбавив концентраты ФБР в 10 раз Результаты исследований показали, что сополимеры ПАК №1 и №4 обладают элюирующими свойствами, но существенных преимуществ по сравнению с элюирующим раствором ПАК не выявлено

Получив концентраты с помощью метода «сорбции-элюции» с использованием 0,5%-ного раствора ПАК и 1/3М ФБР, изготовили эмульсионные вакцины из вируса ящура типа Азия-1 №1737/Грузия/2000 с масляным адъювантом ISA-70 с соотношением водной и масляной фаз 40 60, активность которых испытали на подсвинках В прививной дозе 2 мл содержалось 2 мкг 146S+75S компонента Вакцину вводили в цельном виде и в разведении 1.10 На 10 и 21 дни после вакцинации были отобраны пробы крови Контрольное заражение животных проводили на 21 день после вакцинации адаптированным к свиньям вирусом ящура типа Азия-1 №1737/Грузия/2000 в дозе 10^4 $ИД_{50}$ в 0,2 мл под слизистую оболочку языка Учет результатов опыта производили через 7 суток

Установлено, что иммунный ответ на введенный антиген не имел существенных различий по титрам ВНА на 10 и 21 дни между элюатами с использованием ПАК и 1/3М ФБР ни в дозе 2 мкг/гол, ни в дозе 0,2 мкг/гол 146S+75S компонента, что доказывает эффективность элюции с помощью ПАК

Результаты исследований показали, что оба раствора эффективно элюировали антиген с ГОА Иммуногенность обеих вакцин была достаточной, чтобы защитить всех привитых животных при контрольном заражении

Изучение иммуногенной активности противоящурных вакцин, приготовленных из концентратов, полученных методом «сорбции-элюции» с ПАК и ее сополимерами в качестве адъюванта, на КРС

Антиген вируса ящура типа C_1 №564 концентрировали методом «сорбции-элюции» Готовили вакцину с добавлением ПАК до 3% В цельном виде вакцина содержала 6 мкг 146S+75S компонента и 60 мг ПАК в прививной дозе 2 мл Животным вводили адъювант в дозе 0,3-0,4 мг/кг В качестве контрольной вакцины использовали адсорбат-вакцину, содержащую ГОА и сапонин На 10, 21, 28 и 35 дни после вакцинации были отобраны пробы крови Сыворотки исследовали в реакции нейтрализации в монослойной культуре клеток СП. Контрольное заражение проводили на 35 день после вакцинации афтозным вирусом ящура типа C_1 №564 в дозе 10^4 $ИД_{50}$/0,2мл в подслизистую оболочку языка Учет результатов проводили через 7 суток

Установлено, что к 10 дню после вакцинации у животных идет более быстрое нарастание уровня вируснейтрализующих антител на вакцину, содержащую ПАК в качестве адъюванта, чем на адсорбат-вакцину К 35 дню уровень антител на вакцину с ПАК составил 6,25±0,66 $\log_2$, а на контрольную вакцину 5,13±0,12 $\log_2$ Отмечено, что вакцина с ПАК индуцировала напряженный иммунитет у привитых животных, достаточный для защиты от контрольного заражения на 21-35 день после вакцинации

При сравнении иммуногенности вакцин с сополимерами ПАК №1 и №4 в качестве адъюванта на КРС, показано, что оба образца сополимеров

стимулируют высокий уровень гуморального иммунитета, который способен защитить животных при контрольном заражении вирусом ящура

Изучение иммуногенной активности эмульсионных противоящурных вакцин, приготовленных из концентратов, полученных методом «сорбции-элюции» с ПАК и ее сополимерами, на свиньях

Испытания эмульсионных вакцин с типом эмульсии «вода-масло» проводили на свиньях, используя антиген, полученный методом «сорбции-элюции» Антиген вируса ящура типов А № 1707 Армения/98 и Азия-1 Иран 58/99, сорбировали с добавлением 0,2% концентрации ГОА, затем проводили элюцию 0,5% раствором ПАК с последующим центрифугированием Получали 10-кратные концентраты антигенов и применяли их для изготовления эмульсионных вакцин типа «вода-масло» с адъювантом ISA-70 в отношении 40 60 В прививной дозе 2 мл эмульсионной вакцины из вируса типа А № 1707/Армения/98 содержалось 4 мкг 146S+75S компонентов Наличие ПАК в антигене не препятствует получению стабильной эмульсии «вода-масло»

Контрольное заражение проводили на 21 день после вакцинации, адаптированным к свиньям вирусом ящура в дозе 10^4 $ИД_{50}$/0,2 мл Патологоанатомический осмотр производили через 7 суток после заражения

Показано, что $ИмД_{50}$ для свиней составляет 0,04 мл и, следовательно, в прививной дозе содержалось 50 $ПД_{50}$

Аналогичные результаты получили при испытании вакцины из антигена Азия-1 №1737/Грузия/2000 В прививной дозе вакцина содержала 5,5 мкг 146S+75S компонентов Вакциной привили 15 голов свиней массой 30-50 кг внутримышечно в дозе по 2 мл цельной и разведенной адъювантом ISA-70 в 5 и 25 раз Результаты исследований показали, что $ИмД_{50}$ равнялась 0,05 мл После контрольного заражения заболело одно животное с генерализацией процесса, привитое вакциной в разведении 1 25 Препарат содержал 40 $ПД_{50}$ в прививной дозе

Опыты по изучению иммуногенности вакцин, приготовленных из концентратов, полученных методом «сорбции-элюции» с помощью ПАК, сополимеров ПАК ПВПД, составов 25 75 и 50 50 образцов №4 и №1 и масляным адъювантом проводили на подсвинках и использовали антигены вируса ящура типов А № 1707 Армения/98 и Азия-1 Иран 58/99 Вакцина содержала 6 мкг 146S+75S компонента в прививной дозе В дальнейшем ее разбавили в соотношении 1 7 и прививная доза вакцины стала содержать 0,86 мкг/гол 146S+75S компонента Содержание синтетического адъюванта в вакцине равнялось 60мг в прививной дозе Животным вводили адъювант в дозе 0,75-1,2 мг/кг Сыворотки крови, отобранные на 9 и 22-й дни после иммунизации, исследовали в реакции нейтрализации

Исследования иммуногенности вакцины показали, что сополимеры обладают более выраженной адъювантной активностью Титр вируснейтрализующих антител в сыворотке крови против вируса типа А №1707/Армения/98 был выше с использованием сополимеров в сравнении с контрольной эмульсионной вакциной Вакцина, содержащая в составе сополимер №1 в качестве адъюванта и контрольная, защитили 100% подсвинков

В опытах по сравнению иммуногенности эмульсионных вакцин с ПАК или сополимерами ПАК с иммуногенностью коммерческой эмульсионной вакцины, проведенных на подсвинках, были использованы вакцины с содержанием 6 мкг 146S+75S компонента в прививной дозе. В дальнейшем вакцину разбавили в соотношении 1 7 и прививная доза вакцины стала содержать 0,82 мкг/гол 146S+75S компонента Содержание синтетического адъюванта в вакцине равнялось 60мг в 2мл Животным вводили адъювант в дозе 0,75-1,2 мг/кг На 12 и 20 дни были отобраны сыворотки крови и исследованы в реакции нейтрализации

Заражение животных проводили на 20 день после вакцинации афтозным вирусом ящура типа А №1707/Армения/98 в дозе 10^4 $ИД_{50}$/0,2 мл Учет производили через 7 суток

Установлено, что при контрольном заражении заболели все животные, привитые вакциной без добавления синтетического адъюванта, имея при этом достаточно высокий уровень антител в среднем по группе 4,50±0,38 $\log_2$ Иммунизация вакциной с добавлением сополимера №4 вызывала накопление титра антител 3,92±0,17 $\log_2$ и защищала от контрольного заражения 30% животных Вакцина, содержащая в качестве дополнительного адъюванта, сополимер №1, защищала от контрольного заражения 75% подопытных подсвинков Вакцина с ПАК вызывала защиту у 66% подсвинков

Опыты по испытанию эффективности эмульсионной вакцины в разведении были проведены на подсвинках живой массой 50-80 кг При исследовании иммуногенной активности в опыте использовали концентраты вируса ящура типов А №1707/Армения/98 и Азия-1 Иран 58/99, элюированного 0,5%-ным растворами сополимеров ПАК и ПВПД состава 50 50 (образец 1) и состава 25 75 образца 4 в качестве адъюванта состава 25 75 образца 4 в качестве адъювантов В цельном виде вакцина содержала 2 мкг 146S+75S компонента в прививной дозе В дальнейшем вакцину, содержащую сополимер №1 разбавили в соотношении 1 5 и 1 25, вакцину, содержащую сополимер №4, разбавили в соотношении 1 4 и 1 16 Содержание ПАК в вакцине было 60 мг в 2 мл Животным вводили адъюванта в дозе 0,75-1,2 мг/кг

Результаты показали, что при иммунизации вакциной, содержащей сополимер №1, количество иммуногенных компонентов в прививной дозе вакцины (2 мкг) по валентности типа А №1707/Армения/98 было недостаточным в связи с чем не был достигнут необходимый уровень защиты подсвинков от заражения Прививная доза содержала менее 5 $ПД_{50}$ Иммунизация подсвинков вакциной, содержащей сополимер №4 вызывала формирование напряженного иммунитета и защиту животных при контрольном заражении Следовательно, вакцина, содержащая в прививной дозе 2 мл с содержанием 2 мкг антигена, 60 мг сополимера №4 и 1,2 мл масляного адъюванта ISA-70, защищала животных при контрольном заражении $ИмД_{50}$ составила 0,06 мл

Изучение сохраняемости концентратов, приготовленных методом «сорбции-элюции»

Приготовленные концентраты хранили при температуре 2-8^{0}С Через 18 месяцев хранения отбирали пробы и определяли количество общего вирусного белка и 146S+75S компонентов Установлено, что потери 146S+75S компонентов в концентратах с ПАК, по типу вируса О,№194 составили 0,8-7,2 %, по типу - Азия-1 Иран 58/99 – до 13,3% В концентратах, полученных методом «сорбции-элюции» с применением сополимера №1 и №4 потери составили до 26,6% иммуногенного компонента

ВЫВОДЫ

1 Установлено, что полиакриловая кислота и ее сополимеры являются эффективными адъювантами при изготовлении противоящурных вакцин для иммунизации крупного рогатого скота и свиней Показано, что полиакриловая кислота в дозе 60 мг для крупного рогатого скота и 150 мг для свиней активно стимулирует иммунный ответ и способствует созданию напряженного иммунитета

2 Установлено, что полиакриловая кислота в противоящурных вакцинах не обладает раздражающим действием на ткани лабораторных животных, крупного рогатого скота и свиней

3 Определены токсические дозы полиакриловой кислоты и ее сополимеров для белых мышей (для ПАК – 26,7-44,1 мг/кг, для сополимеров более 200 мг/кг), а также для культуры клеток почки свиньи (СП) (0,2-0,4% концентрация для ПАК и 1,0-1,5% для сополимеров)

4 Показано, что добавление к вирусному антигену полиакриловой кислоты и сополимеров повышает активность вакцины для мышей в 2 раза

5 Установлено, что эффективность адъювантного действия полиакриловой кислоты и ее сополимеров в противоящурных вакцинах зависит от молекулярной массы полиакриловой кислоты и от количества их в прививной дозе

6 Обоснованы и отработаны условия получения концентрированного антигена вируса ящура методом «сорбции-элюции» с использованием 0,5% полиакриловой кислоты, пригодного для изготовления эмульсионных противоящурных вакцин

7 Установлено, что эмульсионные вакцины, изготовленные из антигенов, очищенных и концентрированных методом «сорбции-элюции» с помощью полиакриловой кислоты или сополимеров полиакриловой кислоты, обладают дополнительными адъювантными свойствами и усиливают иммунный ответ у привитых свиней

8 Показано, что вакцины, изготовленные из антигенов, концентрированных методом «сорбции-элюции», были стерильными, авирулентными, безвредными и иммуногенными для крупного рогатого скота и свиней

9 Установлено, что концентраты антигена вируса ящура, полученные методом «сорбции-элюции», сохраняют исходную иммуногенность при хранении при температуре 2-8^{0}С в течение 18 месяцев (срок наблюдения)

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании проведенных исследований разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГУ «Федеральный центр охраны защиты животных»

«Методические рекомендации по получению высокоочищенных концентратов вируссодержащего материала для изготовления противоящурных вакцин и диагностикумов» (2007г)

Материалы научных исследований вошли в подготовленный проект НД на противоящурную вакцину с полиакриловой кислотой в качестве адъюванта, который одобрен ученым советом и утвержден директором ФГУ «Федеральный центр охраны защиты животных» (2007г)

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1 Влияние полигексаметилгуанидина на вирус ящура / Т Н Лезова, В В Михалишин, Д В Михалишин, **Н.Д. Клюкина** // Актуальн пробл инфекц патологии жив-х матер Междунар науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» - Владимир, 2003 – С 401-403

2 Инактивация культурального вируса ящура бинарным этиленимином / Т Н Лезова, Д В Михалишин, Н С Мамков, **Н.Д. Клюкина** // Актуальн пробл инфекц патологии жив-х матер Междунар науч конф , посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» - Владимир, 2003 – С 399-400

3 Клюкина, Н Д Изучение токсических и адъювантных свойств полиакриловой кислоты и ее сополимеров / Н Д Клюкина // Актуальн пробл инфекц патологии жив-х матер Междунар науч конф., посвящен 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ» -Владимир, 2003 – С 403-405

4 Клюкина, Н Д Очистка и концентрирование культурального вируса ящура с помощью полиакриловой кислоты / **Н.Д. Клюкина**, В В Михалишин, Т Н Лезова // Ветеринарная патология - 2006 -№4 -С 39-42.

5 Роль адъювантов в противоящурной вакцине для экстренной защиты / Д В Михалишин, **Н.Д. Клюкина**, Н Н Ходакова, Т Н Лезова // Ветеринарная патология - 2006 -№4 -С 46-48

6. Ходакова, Н Н /Изучение иммуногенной активности и эффективности противоящурной вакцины А, О, Азия-1 в полевых условиях / Н Н Ходакова, **Н.Д. Клюкина**, В А Стариков // Ветеринарная патология - 2006 -№4 -С 48-51

Отпечатано на полиграфической базе ФГУ «Федеральный центр охраны защиты животных»
90 экз апрель 2007г