На правах рукописи

ВАЗИР ЯСЕР

Технология приготовления и антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

16.00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2008

На правах рукописи

ВАЗИР ЯСЕР

Технология приготовления и антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

16.00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВМиБ)

Научный руководитель доктор ветеринарных наук, профессор,
Заслуженный работник высшей школы РФ,
Лауреат премии правительства РФ
Белоусова Раиса Васильевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Соколова Надежда Львовна;
доктор ветеринарных наук, профессор,
Лауреат Государственной премии РФ
Сухарев Олег Иванович.

Ведущая организация. государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ВНИТИБП).

Защита состоится «30» июня 2008 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220 042.01 в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К И. Скрябина» (109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23), тел (495) 377-93-83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Автореферат разослан «23» мая 2008 года

Ученый секретарь
диссертационного совета, профессор Т.Н. Грязнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Аденовирусная инфекция и вирусная диарея крупного огатого скота (ВД КРС) - широко распространены в странах с развитым животноводством и занимают одно из ведущих мест в патологии респираторного и жеудочно-кишечного тракта новорожденных телят По данным отчетности научноетодической лаборатории в России в 60-100 % случаев при заболеваниях телят с имптомами диареи, выделяют аденовирус, ВД или их ассоциацию (Сюрин В Н др 1998)

Величина экономического ущерба при аденовирусной инфекции и ВД РС, складывающаяся из падежа телят, снижения мясной и молочной продуктивности, выбраковки животных, абортов, бесплодия и т д , огромна, а тераевтические меры борьбы с уже возникшим заболеванием малоэффективны оэтому в комплексе противоэпизоотических мероприятий при этих инфекиях ведущее место занимает специфическая профилактика

В арсенале биологической промышленности имеется большое количество репаратов, предназначенных для специфической профилактики респираторных желудочно- кишечных заболеваний телят, которые широко используются в ве-ринарной практике Массовое применение иммунобиологических средств заиты животных требует особого контроля на всех этапах их изготовления, прозводства и использования. Особенно это касается ассоциированных препаратов, оскольку их конструирование из различных антигенов является сложной задаей и предполагает получение вакцины, обладающей высокими антигенными и ммуногенными свойствами по каждому из компонентов.

В последние годы значительно увеличился интерес к проблеме иммунокоррекии, что связано с ухудшением экологической ситуации и воздействием неблагориятных факторов на организм животных Кроме того, интерес к иммуномодуля-орам со стороны практикующих ветеринарных врачей обусловлен возрастающей отребностью в высокоэффективных средствах профилактики вирусных инфекций

В настоящее время в распоряжении ветеринарных специалистов имеются моно- поливалентные вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи РС, однако на отечественном рынке ветеринарных препаратов отсутствуют ассо-

циированные вакцинные препараты против указанных инфекций Поэтому разработка отечественных препаратов против указанных инфекций является своевременным и актуальным.

Цель и задачи исследований.

Целью исследований являлась разработка ассоциированной инактивированной концентрированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1 Оптимизировать условия культивирования аденовируса и вируса вирусной диареи КРС с получением инфекционной активности не ниже $10^{6\,0}$ЦТД$_{50}$/мл

2 Отработать оптимальные условия инактивации полученных вирусов

3 Получить концентрированные вирусные антигены и изучить их антигенную активность

4 Изготовить экспериментальные серии моно- и ассоциированных вакцин и определить антигенные свойства на разных видах животных

5 Испытывать ассоциированную вакцину на естественно восприимчивых животных

6 Исследовать влияние иммуномодуляторов на антигенные свойства вакцины.

Научная новизна работы

Впервые разработана ассоциированная инактивированная концентрированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота.

Предложена модифицированная методика получения очищенных и концентрированных препаратов аденовирусов и вируса вирусной диареи КРС, пригодных для создания вакцин

Дано научное обоснование и показана эффективность применения иммуномодуляторов и ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

Практическая значимость работы. Результаты исследований вошли в нормативную техническую документацию· временная инструкция по изготов-

лению и контролю вакцины ассоциированной концентрированной инактивированной против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота, технические условия изготовления и контроля вакцины ассоциированной концентрированной инактивированной против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота; наставление по применению ассоциированной инактивированной концентрированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

Полученные результаты являются основой для дальнейших исследований механизмов и закономерностей формирования поствакцинального противовирусного иммунитета у КРС и могут быть использованы при изучении патогенеза и иммуногенеза инфекций, вызываемых аденовирусами и вирусом вирусной диареи КРС

Полученные результаты используются в учебном процессе по дисциплине «Молекулярная биология вирусов» для студентов 4 и 5 курсов ветеринарно-биологического факультета ФГОУ ВПО МГАВМиБ

Апробация работы. Результаты работы доложены на международной научной практической конференции молодых ученых ВНИиТИБП, (Щелково, 2004), 3-ей конференции по учебно-методической, воспитательной и научно-практической работе ФГОУ ВПО МГАВМиБ (Москва, 2006), конференции по актуальным проблемам инфекционной патологии и иммунологии животных (Москва, 2006), конференции «Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии» (Москва, 2006)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 научных статей, в т.ч 8 статей в сборниках научных трудов, 3 статьи – в научных журналах, рекомендованные ВАК РФ

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 145 страницах и содержит следующие разделы введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследования, выводы, данные о практическом использовании научных результатов, рекомендации по использованию научных выводов, приложения Список использованной литературы включает 297 источников, из которых 198 - иностранных авторов Работа иллюстрирована 14 рисунками и 17 таблицами

Личный вклад соискателя. Работа выполнена соискателем самостоятельно В выполнении отдельных этапов, связанных с культивированием, очисткой и концентрированием вирусов, принимали участие к б н доцент И.В Третьякова, к.б н Т П Лобова, д б н., профессор Е И Ярыгина, за что автор приносит им благодарность

Основные положения и результаты, выносимые на защиту.

- технология очистки и концентрирования вирусов аденовирусной инфекции и ВД КРС;

- условия приготовления экспериментальных серий моно- и ассоциированных вакцин и результаты изучения их антигенных свойств на разных видах животных;

- схема введения ассоциированной вакцины,

- результаты исследований по оценке влияния иммуномодуляторов на антигенные свойства вакцины

СОТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в период с 2004 по 2008 гг. на кафедре ветеринарной вирусологии ФГОУ ВПО МГАВМиБ

Материалы и методы исследований

В работе использованы аденовирус, штамм Bovin-10 и вирус вирусной диареи КРС, штамм Origon с инфекционными титрами $10^{6,25}$ ЦТД^{50}/мл и $10^{7,75}$ ЦТД$_{50}$/мл, соответственно

Культуры клеток почки теленка Таурус-1 (Т-1) и коронарных сосудов сердца теленка (КСТ) получали на кафедре ветеринарной вирусологии МГАВМиБ им К И Скрябина Культуры клеток Т-1 и КСТ заражали аденовирусом и вирусом ВД КРС в дозах 0,1 и 0,03 ЦТД$_{50}$/клетку, соответственно Вирусы титровали микро- и макрометодами на соответствующих культурах клеток.

Для концентрирования вирусов использовали полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 Дальтон (ПЭГ-6000), гексаметафосфат натри ГМФ-Na

Для инактивации вирусных антигенов применяли формалин 40 %, а в качестве адъюванта использовали гидроокись алюминия

Полноту инактивации вирусов оценивали путем проведения трех слепых пассажей на соответствующей культуре клеток

Экспериментальные образцы биопрепаратов проверяли на стерильность и без-

вредность общепринятыми методами

В качестве иммуномодуляторов в работе использовали. 0,4% раствор фосфренила и 0,2% раствор гликопина

Изучение антигенной активности вакцин проводили на 206 белых крысах, 46 кроликах, 12 козах и 20 телятах.

Определение титра антител в сыворотке крови животных проводили в реакциях нейтрализации (РН), непрямой гемагглютинации (РНГА) и диффузионной преципитации (РДП)

Математическую обработку результатов проводили с использованием персонального компьютера и пакета прикладных программ Microsoft Developer Studio Для аппроксимации результатов вычислений применяли математический метод наименьших квадратов. Достоверность результатов оценивали по методу Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Отработка культивирования аденовируса и вируса вирусной диареи с инфекционными титрами не ниже $10^{6\,0}$ $ТЦД_{50}$/мл.

В предварительных опытах было установлено, что в высоких титрах ($10^{6\,25}$ $ТЦД_{50}$/мл) аденовирус стабильно накапливается в культуре клеток Т-1 через 72 часа после заражения при дозе 0,1 $ТЦД_{50}$ на клетку, а вирус ВД КРС ($10^{7\,75}$ $ТЦД_{50}$/мл) в культуре клеток КСТ через 48 часов при дозе 0,03 $ТЦД_{50}$ на клетку

Очистка и концентрирование аденовируса КРС и вируса вирусной диареи КРС.

Для концентрирования в 10 раз вирусных антигенов методом осаждения использовали ПЭГ - 6000 в различных концентрациях (6, 8, 10 и 12 %), а при изофокусировании – раствор гексаметафосфата натрия (ГМФ-Na) с разными значениями pH (3,5, 4, 4,5, 5, 5,5)

Установлено, что оптимальная конечная концентрация ПЭГ 6000 для концентрирования аденовируса КРС составила - 10 %, а вируса ВД КРС - 8 %, при этих концентрациях потеря инфекционной активности была минимальной (10,09 % и 10,87 %, соответственно), при этом, очистка от балластных белков была максимальной и составляла 73,26 % и 85,49 %, соответственно При концентрировании аденовируса и вируса ВД КРС изофокусированием с помощью ГМФ-Na установили, что значения pH для аденовируса, равное 4,5, а для ви-

руса ВД КРС - 4,0, являются оптимальными (потеря инфекционности 20,57 % и 20,57%, а степень очистки составила 69,76 и 82,85 %, соответственно) Антигенную активность культуральных и концентрированных препаратов аденовируса и вируса вирусной диареи КРС определяли в конкурентном варианте ИФА со специфическими гипериммунными сыворотками КРС. Планшеты сенсибилизировали аффинно - очищенным антигеном аденовируса или вируса ВД КРС В результате проведения конкурентного ИФА показано, что концентрирование аденовируса и вируса ВД КРС методом изофокусирования позволяет получать вирусные препараты с наименьшей потерей антигенной активности в сравнении с методом концентрирования с помощью ПЭГ-6000.

Отработка оптимальных условий инактивации аденовируса и вируса вирусной диареи КРС.

В качестве инактиванта вирусов использовали 40%-ный раствор формалина в конечной концентрации 0,1%, 0,2 % и 0,3 % Полноту инактивации оценивали на соответствующих культурах клеток путем проведения трех слепых пассажей

Результаты проведенных пассажей позволили сделать заключение, что для инактивации образцов аденовируса и вируса ВД КРС концентрация формалина 0,1 % недостаточна При применении в качестве инактиванта формалина в концентрации 0,2 % и 0,3 % достигалась полная инактивация. в культурах клеток на протяжении трех пассажей не было зарегистрировано цитопатического действия вирусов.

Антигенную активность инактивированных вакцинных препаратов определяли на 35 белых крысах Кровь для исследования получали на 30 день после иммунизации.

Титр нейтрализующих антител к аденовирусу при концентрации формалина 0,3 % был меньше, чем при концентрации 0,2 % на 0,24 $\log_2$, а разница титров антител в РНГА составила 0,2 $\log_2$ Титр антител к аденовирусу снижался после проведения инактивации на 1,5 $\log_2$ в РН, на 2,2 $\log_2$ в РНГА. Разница в титре антител к вирусу ВД КРС при использовании формалина в конечной концентрации, равной 0,3 % и 0,2 %, была незначительна, и составила в РН 0,13 $\log_2$ Титр антител к вирусу ВД КРС после инактивации формалином снижался на 1,5 $\log_2$ в РН, на 2,0 $\log_2$ в РНГА

Таким образом, результаты определения антигенной активности инакти-

вированных препаратов указывают на то, что концентрация формалина практически не влияла на уровень антител к аденовирусу и к вирусу ВД КРС, что позволило в дальнейшем для приготовления вакцинных препаратов использовать наименьшую концентрацию формалина, равную 0,2 %

Изготовление экспериментальных серий моно- и ассоциированных вакцин и сравнение их свойств на разных видах животных.

Вирусы концентрировали двумя методами 1) осаждением с помощью полиэтиленгликоля и 2) изофокусированием с помощью гексаметафосфата натрия (ГМФ-Na)

При получении вирусной суспензии разделяли ее на 3 части Первую часть оставляли для приготовления культуральной вакцины, вторую концентрировали в 5 раз осаждением с помощью полиэтиленгликоля Третью часть концентрировали в 5 раз методом изофокусирования т к известно, что эффективным адъювантом для одноименных моновакцин является гидрат окиси алюминия, для приготовления вакцин добавляли его в установленной оптимальной концентрации, равной 1,3 %

Таким образом, были получены шесть образцов экспериментальных моновакцин три вакцины против аденовирусной инфекции КРС - культуральная и концентрированные ПЭГ-6000 и ГМФ-Na, и 3 вакцины против вирусной диареи

Антигенную активность экспериментальных серий вакцин оценивали на 60 белых крысах Животным вводили культуральные вакцины в дозе 1,0 мл, а образцы концентрированных вакцинных препаратов в 3-х дозах 0,1, 0,2 и 0,5 мл.

Установлено, что антигенная активность культуральной вакцины против аденовирусной инфекции КРС в дозе 1,0 мл оказалась выше, чем у препаратов, сконцентрированных ПЭГ и ГМФ-Na и примененных в дозе 0,2 мл (титр антител к указанным препаратам составил в РН 10,0; 8,38 и 9,01 $\log_2$, соответственно) Титр поствакцинальных антител к концентрированным ПЭГ препаратам при дозе 0,1 и 0,2 мл составил в РН 9,07 и 8,38 $\log_2$, соответственно

Титр вируснейтрализующих антител при использовании концентрированной ГМФ-Na вакцины достиг значения 9,17 и 9,01 $\log_2$ при дозах введения 0,1 и 0,2 мл соответственно

При введении концентрированных ПЭГ-6000 или ГМФ-Na вакцин в дозе 0,5 мл титр антител у животных соответствующих групп был ниже на 1,74 $\log_2$

и на 0,55 $\log_2$, чем в контрольной группе, в которой животным вводили культуральную вакцину Различия в антигенной активности культуральной вакцины против ВД КРС и концентрированных с помощью ПЭГ и ГМФ-Na вакцин, примененных в дозе 0,2 мл, также незначительны на 0,7-0,9 $\log_2$ при концентрировании ПЭГ и на 0,4-1,5 $\log_2$, при концентрировании ГМФ-Na

Было установлено, что антигенная активность концентрированных вакцин практически не зависела от способа концентрирования вирусных антигенов

Таким образом, культуральные вакцины, введенные в дозе 1,0 мл, и концентрированные моновакцины против аденовирусной инфекции и ВД КРС в дозе 0,1, 0,2 и 0,5 мл обладали высокой антигенной активностью при введении крысам

При применении концентрированной ПЭГ или ГМФ-Na вакцины в дозе 0,1 мл титры антител в РН были достаточно высоки, как к аденовирусу (9,07 и 9,17 $\log_2$), так и к вирусу ВД КРС (8,07 и 7,92 $\log_2$), но незначительно отличались от титров при введении препаратов в дозах 0,2 и 0,5 мл p ($> 0,05$)

По результатам проведенных исследований сделано заключение о целесообразности применения на крысах ассоциированной концентрированной вакцины в дозе 0,1 мл, т к она с точки зрения эффективности и экономичности является наиболее оптимальной

При выборе способа концентрирования вакцинных препаратов были учтены следующие показатели сохранность антигенной активности концентрированных препаратов; технологичность в применении; экономичность, а также тот факт, что ПЭГ применяется на биофабриках для очистки и концентрирования вирусов при производстве различных вакцин, а ГМФ-Na лучше использовать в процессе приготовления диагностических препаратов Поэтому в дальнейшей работе для очистки и концентрирования вирусов в процессе конструирования вакцин мы использовали полиэтиленгликоль

На следующем этапе работы изучали антигенную активность инактивированной ассоциированной культуральной вакцины против вирусной диареи и аденовирусной инфекции КРС. Для этого образцы моновакцин объединяли в соотношении 1 1 Антигенную активность ассоциированных и монопрепаратов определяли на 25 белых крысах. Животным вводили моновакцины в дозах 1,0 мл, а ассоциированную вакцину в дозах 1,0 или 2,0 мл Сыворотку крови

исследовали в РН, РНГА и РДП, а также определяли относительное количество В- и Т-лимфоцитов в реакции розеткообразования

Титры антител к аденовирусу и вирусу ВД КРС при введении ассоциированной вакцины в дозе 2,0 мл составили 9,45 log_2 и 9,65 log_2 в РН, 10,2 и 10,0 log_2, в РНГА, соответственно, а при введении моновакцин - 8,9 log_2 и 9,3 log_2 в РН и 9,2 и 10,0 log_2 в РНГА, соответственно

Следовательно, антигенная активность ассоциированной культуральной вакцины по отношению к аденовирусу и вирусу вирусной диареи КРС в дозе 2,0 мл и моновакцин указанных вирусов в дозе введения 1,0 мл достоверно не различалась ($p > 0,05$)

Однако, сокращение дозы введения ассоциированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС до 1,0 мл значительно снижает ее антигенную активность (на 4,26 log_2 в РН и 4,4 log2 в РНГА к аденовирусу и 4,5 log_2 в РН и 4,4 log2 в РНГА к ВД КРС) ($p < 0,01$)

Экспериментальная ассоциированная вакцина стимулировала также и клеточный иммунитет, что подтверждается увеличением относительного количества Т- и В-лимфоцитов у животных опытной группы после введения препарата по сравнению с контрольными группами, животным которых вводили плацебо (на 15,92 % для Т-лимфоцитов и на 2,66 % для В-лимфоцитов)($p < 0,01$)

Концентрированные ПЭГ образцы моновакцины против аденовирусной инфекции и ВД КРС объединяли в соотношении 1 1. Антигенную активность микросерий вакцины оценивали на 16 крысах Животным вводили культуральную ассоциированную вакцину в дозе 2 мл, а концентрированную ассоциированную вакцину в дозах 0,2 и 0,4 мл

Титр вируснейтрализующих антител к аденовирусу и вирусу ВД КРС при доза введения концентрированного препарата - 0,2 мл, был соответственно ниже на 1,14 log_2 и 0,62 log_2 по сравнению с группой, где крыс иммунизировали культуральной ассоциированной вакциной в дозе 2,0 мл При дозе введения 0,4 мл титр антител в РН к аденовирусу и вирусу ВД КРС снижался на 0,79 и 0,91 log_2, соответственно.

Таким образом, концентрированная ассоциированная вакцина против аденовирусной инфекции и ВД КРС обладает высокой антигенной активностью

и ее использование в практике предпочтительнее по сравнению с культураль ной вакциной, поскольку позволяет уменьшить дозу введения без потери ан тигенной активности ($p > 0,05$)

Культуральные и концентрированные ассоциированные вакцины испытали н козах. Животным вводили культуральную вакцину в дозе 5,0 мл, а концентриро ванные вакцины по 1,0 мл Кровь получали на 15 и 30 день после вакцинации

Наиболее высокий титр антител к аденовирусу был, достигнут при исполь зовании вакцины, полученной из культуральных вирусов. его значения на 3 день составили 8,0 $\log_2$ в РН и 8,5 $\log_2$ в РНГА. При применении концентриро ванных препаратов титры антител были ниже и составили 7,39 $\log_2$ в РН и 8, $\log_2$, в РНГА

Титр антител к вирусу вирусной диареи КРС также был максимален при введении культуральной вакцины по сравнению с концентрированной вакци ной значения титров составили в РН 9,04 и в РНГА 10,0

Несмотря на тот факт, что при использовании концентрированной вакци ны уровни специфических поствакцинальных антител были ниже на один log по сравнению с применением культуральной вакцины, мы рекомендуем при менять именно концентрированную вакцину, т к в процессе концентрирова ния в препарате было значительно уменьшено содержание культуральны белков, что позволило снизить риск проявления аллергических реакций посл вакцинации, а также в 5-10 раз уменьшить дозу препарата.

Оптимизация схемы введения ассоциированной вакцины. На следую щем этапе работы оценивали антигенную активность ассоциированных куль туральной и концентрированной вакцин против аденовирусной инфекции вирусной диареи КРС на телятах при введении различных доз препаратов Животных иммунизировали в дозах 10 мл культуральной вакциной и концен трированными препаратами в дозах 3, 2, 1 мл Кровь получали на 0, 15, 30; 10 и 240 день после иммунизации

Наивысший уровень антител к аденовирусу в РН после однократного введени культуральной вакцины отмечали на 15-й день (6,63 $\log_2$) по сравнению с концен трированной в дозах 3,0, 2,0 и 1,0 мл (6,13, 5,88 и 4,9 $\log_2$, соответственно) К виру су ВД КРС уровень поствакцинальных антител также достигал максимума посл введения культуральной вакцины (8,5 $\log_2$).

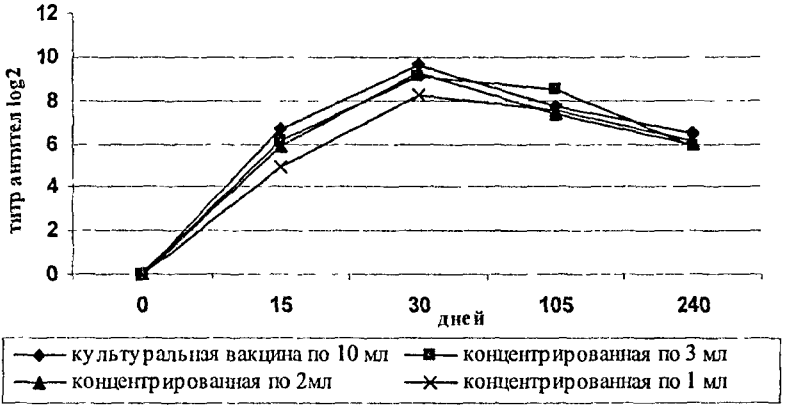

Рис. 1. Титр нейтрализующих антител в сыворотке крови телят к аденовирусу КРС

Титры антител после применения концентрированных препаратов в дозах 3,0, 2,0 и 1,0 мл составил 6,88, 7,25, 6,0 log_2, соответственно. На 30-й день уровни поствакцинальных антител повысились и достигали в РН значений. 9,63, 9,25; 9,13 и 8,25 log_2 к аденовирусу, а к вирусу ВД КРС - 11,0, 10,38; 10,12 и 8,5 log_2 (при применении культуральной вакцины и концентрированной в дозах 3,0, 2,0 и 1,0 мл введенного препарата, соответственно)

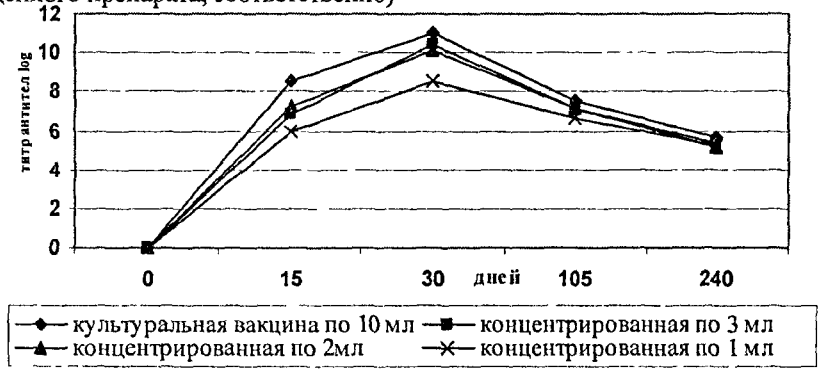

Рис. 2. Титр нейтрализующих антител в сыворотке крови телят к вирусу ВД КРС

Титры антител оставались на достаточно высоком уровне и через 105 дней от начала вакцинации и составляли в РН от 7,3 до 8,5 log_2 к аденовирусу и от 6,6 до 7,1 log_2 к вирусу ВД КРС, и в РНГА от 8,5 до 9,0 log_2 к аденовирусу и от 7,7 log_2 и до 8,2 log_2 к вирусу ВД КРС

Поствакцинальные антитела сохранялись на высоком уровне спустя 8 месяцев от вакцинации, к 240-му дню, титр нейтрализующих антител к аденовирусу составлял 6,50 log_2 при введении ассоциированной культуральной вакцины и 8,5, 7,38 и 7,5 log_2 при введении концентрированной вакцины в дозах 3,0; 2,0 и 1,0 мл, соответственно Разница в титре нейтрализующих антител к аденовирусу при введении ассоциированной культуральной вакцины и концентрированной в дозе 1,0 мл была не достоверной ($p > 0,05$) Титр нейтрализующих антител к вирусу ВД КРС составлял 5,63, 5,40, 5,15 и 5,22 log_2, соответственно Также титры антител к вирусу ВД КРС при введении культуральной и концентрированной вакцин в разных дозах достоверно не отличались ($p > 0,05$).

Динамику антител, индуцированных экспериментальной ассоциированной концентрированной вакциной, изучали на 5 кроликах, которым препарат водили в дозе 0,4 мл, кровь получали до вакцинации и в различные сроки до 420-го дня от начала опыта

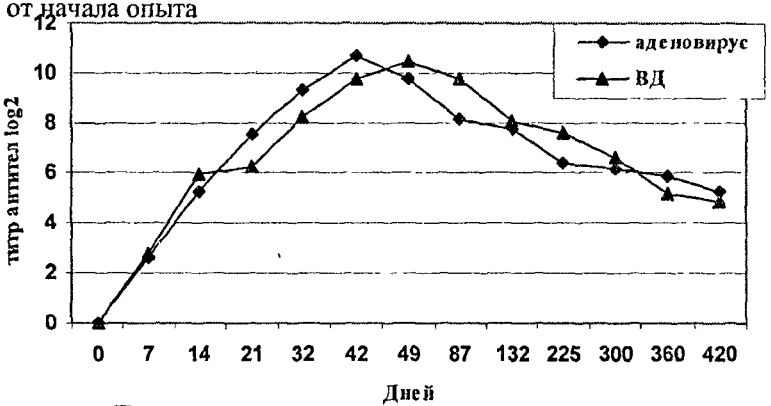

Рис. 3. Титр поствакцинальных антител в сыворотке крови кроликов к аденовирусу и вирусу диареи КРС

Таким образом, ассоциированная инактивированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС вызывает синтез нейтрализующих антител в высоких титрах, которые в течение длительного времени персистируют в организме лабораторных животных

Влияние иммуномодуляторов на активность экспериментальных моно- и ассоциированных вакцин.

Влияние иммуномодуляторов (фоспренил и гликопин) на антигенную активность культуральных моновакцин против аденовирусной инфекции и ВД КРС

изучали в опытах на 70 крысах Животным вводили культуральную вакцину против аденовирусной инфекции КРС, а также культуральную вакцину против ВД КРС Фоспренил (ФП) в дозе 0,05 мг и гликопин (ГП) в дозе 0,03 мг вводили крысам соответствующих групп, однократно с первой иммунизацией

При введении вакцины против аденовирусной инфекции без иммуномодулятора относительное количество Т- и В-лимфоцитов составляло 53,36 и 11,6 %, соответственно Применение фоспренила одновременно с вакциной приводило к повышению относительного количества Т- и В-лимфоцитов на 4,44 и 4,14 %, а при применении гликопина - на 4,52 и 4,00 %, соответственно.

Применение фоспренила и гликопина с вакциной против ВД КРС способствовало увеличению относительного количества Т-лимфоцитов на 6,54 % и 7,02 % и В-лимфоцитов на 4,40 % и 4,58 %, соответственно

Использование иммуномодуляторов с моновакцинами против ВД КРС и аденовирусной инфекции практически не оказывало влияния на уровень специфических антител

Таким образом, применение иммуномодуляторов фоспренила и гликопина с вакцинами против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС практически не оказывало влияния на уровень специфических антител ($p > 0,05$), но активизировало факторы клеточного иммунитета

Испытание культуральной ассоциированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС с иммуномодуляторами провели на 42 кроликах Фоспренил в дозе 0,2 мг/кг и гликопин в дозах 0,12 мг/кг и 0,25 мг/кг, вводили одновременно с вакциной

Анализ полученных данных (см табл) показал, что на 14 день после иммунизации титр антител к аденовирусу увеличивался, но не более чем на 0,5 $\log_2$ по сравнению с контролем, и снижался к вирусу ВД КРС в переделах от 0,3 до ,77 $\log_2$ На 14 день после ревакцинации регистрировали повышение уровня антител у всех животных к аденовирусу и вирусу вирусной диареи в переделах 0,48 – 1,54 $\log_2$ и 0,1 – 0,77 $\log_2$, соответственно

При одновременном использовании с вакциной иммуномодуляторов наблюдается тенденция к повышению у кроликов уровней антител к обоим вирусам При однократном введении фоспренила титр антител увеличился на 0,98 $\log_2$ к аденови-

русу ($p > 0,05$) и 0,47 $\log_2$ к вирусу ВД КРС ($p > 0,05$). Гликопин в дозе 0,12 мг/кг при двукратном введении вызывал увеличение титра антител на 0,88 $\log_2$ к аденовирусу и на 0,77 $\log_2$ к вирусу ВД КРС ($p > 0,05$).

Титр антител в сыворотке крови кроликов, иммунизированных ассоциированной культуральной вакциной против аденовирусной инфекции и ВД КРС с использованием иммуномодуляторов фоспренила и гликопина

№ п/п	Вводимые препараты	титры нейтрализующих антител в $\log_2$ (M ± m)					
		перед вакцинацией		перед ревакцинацией (на 14 день)		через 14 дней после ревакцинации	
		аденовирус	ВД	аденовирус	ВД	аденовирус	ВД
1	Вакцина	<1,0	<1,0	6,06± 0,61	7,0± 0,52	7,23± 0,94	7,92± 0,94
2	Вакцина + ФП 0,2 мг/кг (однократно)	<1,0	<1,0	6,25± 0,80	6,4± 0,52	8,21± 0,8	8,59± 0,36
3	Вакцина + ФП 0,2 мг/кг (двукратно)	<1,0	<1,0	6,59± 0,87	5,83± 0,76	8,42± 0,13	7,82± 0,28
4	Вакцина + ГП 0,12 мг/кг (однократно)	<1,0	<1,0	6,46± 0,55	6,72± 0,56	7,71± 0,50	8,42± 0,65
5	Вакцина + ГП 0,12 мг/кг (двукратно)	<1,0	<1,0	6,2± 0,34	6,67± 0,31	8,16± 0,71	8,69± 0,56
6	Вакцина + ГП 0,25 мг/кг (однократно)	<1,0	<1,0	6,59± 0,64	6,17± 0,28	8,77± 0,50	8,11± 0,42
7	Плацебо	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0

Примечания: ФП – фоспренил; ГП – гликопин

При изучении влияния иммуномодуляторов на относительное количество Т- и В-лимфоцитов установлено, что наибольшее увеличение относительного количества Т-лимфоцитов отмечено у кроликов, иммунизированных ассоциированной вакциной с ГП в дозе 0,12 мг/кг двукратно (на 5, 56 %) или дозе 0,25 мг/кг однократно (на 5,98 %) ($p < 0,01$) Двукратное видение фоспренила повышало относительное количество Т- и В-лимфоцитов на 5,52 % ($p < 0,01$)

У животных контрольной группы, которых вакцинировали без иммуномодуляторов, повышение относительного количества Т- и В-лимфоцитов было значительно ниже (0,76 % и 1,88 %, соответственно)

Таким образом, совместное введение ассоциированной культуральной вак-

цины с ФП или ГП достоверно увеличивает их количество Т-лимфоцитов на 2,33-6,52 % и В-лимфоцитов на 1,38-3,0 Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение иммуномодуляторов фоспренила и гликопина совместно с ассоциированной инактивированной культуральной вакциной против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС стимулирует как клеточный, так и гуморальный иммунитет

ВЫВОДЫ

1. Разработана ассоциированная инактивированная концентрированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота В опытах на лабораторных животных и телятах препарат оказался безвредным, обладая выраженной антигенной активностью, которая сохранялась 14 месяцев (срок наблюдения)

2 Аденовирус первого серотипа (шт Bovine-10) и вирус диареи КРС (шт Origon) в перевиваемых культурах клеток почки теленка и коронарных сосудов теленка вызывают цитопатический эффект и репродуцируются стабильно с инфекционным титром $10^{6,25}$ $ЦТД_{50}$/мл и $10^{7,75}$ $ЦТД_{50}$/мл, соответственно

3 Формалин в конечной концентрации, равной 0,2%, является универсальным инактивантом для аденовируса и вируса вирусной диареи КРС при экспозиции 72 часа и температуре 37 ^{0}С; с концентрацией адъюванта (гидроокись алюминия) – 1,3 %.

4. Способ концентрирования аденовируса и вируса вирусной диареи КРС ПЭГ с молекулярной массой 6000 в конечной концентрации, равной 10,0 % и 8,0 %, соответственно, является унифицированным, оптимальным для получения вирусов с высокой антигенной активностью

5 Наличие двух компонентов (в соотношении 1 1) в ассоциированной вакцине не снижает ее антигенную активность в отношении аденовируса и вируса диареи КРС.

6 Концентрированные моно - и ассоциированная вакцины индуцировали синтез нейтрализующих антител к аденовирусу и вирусу вирусной диареи КРС у лабораторных животных в высоком титре от 9 5 log_2 до 10 0 log_2, которые сохранялись на уровне не ниже 5,0 log_2 до 420 дней (срок наблюдения)

7 Установлена оптимальная доза ассоциированной инактивированной концентрированной вакцины для естественно восприимчивых животных, которая соста-

вила 1,0 мл, что в 10,0 раз меньше по сравнению с ассоциированной культуральной вакциной. При этом сохранялась высокая активность вакцинного препарата

8 Двукратное введение ассоциированной инактивированной концентрированной вакцины телятам в дозе 1,0 мл стимулирует синтез высокого уровня антител к аденовирусу и вирусу ВД КРС (8,25 и 8,5 $\log_2$ в РН и 8,75; 9,0 $\log_2$ в РНГА, соответственно), и их сохранение в течение 8 месяцев в титрах 6,17, 5,22 $\log_2$ в РН и 7,5, 5,75 $\log_2$ в РНГА, соответственно

9. Иммуномодуляторы фоспренил в дозе 0,2 мкг/кг и гликопин в дозе 0,12 мкг/кг при однократном введении с ассоциированной вакциной оказывают влияние на факторы клеточного и гуморального иммунитета относительное количество Т- и В-лимфоцитов увеличивается в среднем на 7,0 % и 3,0 % , соответственно, при этом титр нейтрализующих антител повышается в среднем на 2,0 $\log_2$.

10 Сочетанное применение ассоциированной инактивированной вакцины с иммуномодуляторами, повышает антигенную активность вакцинных препаратов против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработан проект нормативной документации на вакцины

1. Временная инструкция по изготовлению и контролю вакцины ассоциированной концентрированной инактивированной против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота

2 Технические условия ассоциированной концентрированной инактивированной против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота.

3. Инструкция по применению ассоциированной инактивированной концентрированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота.

Результаты исследований используются в учебном процесс в ФГОУ ВПО МГАВМиБ по дисциплине «Ветеринарная вирусология»

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1 После проведения широкомасштабных испытаний ассоциированная инактивированная концентрированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС рекомендуется для применения в скотоводстве.

2 Полученные результаты по очистке и концентрированию вирусов рекомендуются для использования в высших учебных заведениях по курсу дисциплин «Вирусология, Молекулярная биология вирусов и Биотехнология»

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1 Распространение респираторно-кишечных инфекций в условиях республики Таджикистан /З Д. Курбонбекова, М Косумбеков, Я Вазир, Р В Белоусова и др //Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. Сб науч тр ВНИТИБП – Щелково ВНИиТИБП - 2004 – С 143-147

2 Влияние иммуномодуляторов на антигенную активность вакцины против аденовирусной инфекции крупного рогатого скота /Я Вазир, М.В Третьякова, Т П Лобова. и др //Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов Сб науч тр ВНИТИБП. – Щелково: ВНИиТИБП - 2004 – С 147-151

3. Выделение и идентификация вирусов парагриппа-3 и вирусной диареи от молодняка крупного и мелкого рогатого скота с респираторно-кишечной патологией /З Д Курбонбекова, Я Вазир, И В. Третьякова и др //Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии Сб науч тр МГАВМиБ – М· МГАВМиБ.- 2006 – С 103-110

4 Изучение антигенной активности моновалентной и бивалентной вакцины против аденовирусной вирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота /Я. Вазир, З Д. Курбонбекова, И.В. Третьякова и др //Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии· Сб науч тр МГАВМиБ – М МГАВМиБ - 2006 – С 100-103

5 Снижение заболеваемости, повышение сохранности и привесов животных и птицы при применении Фоспренила - стимулятора естественной резистентности и иммунитета /А В Деева, М Л Зайцева., Г Г Мехдиханов, Т П. Лобова, И В. Третьякова., П А Ростроса , Я Вазир и др //Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии Сб науч тр. МГАВМиБ – М : МГАВМиБ - 2006.– С. 95-99.

6. Эпизоотическая ситуация среди молодняка крупного и мелкого рогатого скота с респираторно-кишечной патологией в Центральных районах Таджикистана /З Д Курбонбекова, Г Бобоев, Я. Вазир и др. //Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных· Сб. науч тр ВИЭВ – М ВИЭВ - 2006.– С 84-87

7. Полипренилфосфаты растительного происхождения подавляют накопление белков вируса инфекционного ринотрахеита и аденовируса крупного рогатого скота в чувствительной культуре клеток /С В Ожерелков, Т Н. Кожевникова, Р С Годунов, Я. Вазир и др. //Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных Сб науч тр. ВИЭВ – М ВИЭВ - 2006 – С 643-647

8 Влияние иммуномодуляторов на антигенную активность моновалентных вакцин против аденовирусной инфекции и вирусной диареи КРС /Я Вазир, И В. Третьякова, Г И Устинова и др //Материалы 3-й конференции п учебно-методической, воспитательной и научно-практической работе ФГО ВПО МГАВМиБ - 2006 - часть 1 - С 230-233

9. Циркуляция вирусов парагриппа-3, вирусной диареи и хламидии у рогатого скота с респираторно-кишечной патологией в центральных районах Таджикистана /З Д Курбонбекова, Я Вазир, Т П Лобова и др //Международный научно-практический журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии «Ветеринарная патология» – 2007. - № 1 (20) – С 137-139

10 Испытание бивалентной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота на кроликах с использованием иммуномодуляторов /Я Вазир, Р В Белоусова, Г И Устинова и др //Международный научно-практический журнал по фундаментальным и прикладным вопросам ветеринарии «Ветеринарная патология». – 2007. - № 3 (22) – С. 199-202

11 Антигенные свойства экспериментальной ассоциированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота /Я Вазир, И В Третьякова, Е И Ярыгина и др //Ветеринария - 2008 - № 4 - С 23-26.