

Абишов А.А.

*ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт»,
АО «КазАгроИнновация», г. Алматы, Райымбека 223^А*

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СЕРОТИПА АЗИЯ-1 ВИРУСА ЯЩУРА

Аннотация В статье представлены результаты изучения протективной активности моновалентной эмульгированной противоящурной вакцины на морских свинках. Установлены сроки формирования напряженного иммунитета после вакцинации против ящура на основе определения динамики образования комплемент связывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител контрольного заражения вирулентным штаммом типа Азия-1.

Ключевые слова: ящур, антитела, перевиваемая культура клеток ВНК-21/13, серотип.

Введение Ящур – трансграничная, остропротекающая высококонтагиозная вирусная болезнь парнокопытных животных, характеризующаяся лихорадкой, везикулярным поражением слизистых оболочек ротовой полости, кожи венчика и вымени, обильным слюнотечением, у молодняка – поражением миокарда и скелетных мышц. Инфекция может очень быстро распространяться на большие территории, поражая различных животных и нанося ощутимый экономический ущерб животноводческой отрасли [1, 2, 3, 4].

В настоящее время ящур продолжает оставаться самым распространенным заболеванием парнокопытных животных, способным протекать в виде эпизоотий и вызывать чрезвычайные ситуации в животноводстве с тяжелыми социально-экономическими последствиями. Анализ официальных данных МЭБ свидетельствует о довольно напряженной ситуации в мире по данной инфекции. Так, в 2004 -2005гг. неблагополучными по ящуру были 59 стран, в том числе 27 азиатских, 26 африканских и 5 южноамериканских [3, 4, 7]. В последние годы в мире отмечается тенденция к возрастанию числа вспышек ящура типа Азия-1. В сентябре 1999 года, впервые после 1991 года, ящур этого типа был зарегистрирован в Иране. В октябре 1999 года его установили в Турции, затем в 2000-2001 гг. он был занесен в Армению и Грузию, Грецию и Азербайджан, а в 2003 году – в Таджикистан. В 2001-2005гг. вспышки ящура типа Азия-1 отмечены также в Афганистане, Индии, Китае, Монголии, Пакистане, Таиланде. В первом полугодии 2006 года о неблагополучии по ящуру официально в МЭБ сообщили 10 государств [5]. Первые случаи ящура данного типа в Китае были отмечены среди КРС в зоне предубойного содержания животных на бойне в Гонконге 9 марта 2005 года. В последующее время с апреля по декабрь 2005 года вспышки ящура типа Азия1 были зарегистрированы и на территории континентального Китая в 7 из 30, имеющихся провинций на юго-востоке, востоке, северо-западе и в центре страны. Особое внимание было обращено на две вспышки, зарегистрированные в мае и июне 2005 года в Синьцзян-Уйгурском автономном районе, который располагается на северо-западе КНР и граничит с Казахстаном, Киргизией, Таджикистаном, Монголией и Россией [6,8,9].

Во второй половине 2003 и в начале 2004 годов в южном регионе нашей страны были (Алматинской и Южно-Казахстанской областях) зарегистрированы случаи заболевания парнокопытных животных ящуром. В процессе проведения комплексных лабораторных исследований патологических материалов, поступивших из различных районов Южного региона были выделены полевые штаммы вируса ящура, которые при серологических исследованиях были идентифицированы как серотип Азия-1 возбудителя ящура. В предыдущие годы в результате проведенных научно-исследовательских работ нами получен производственный штамм для изготовления диагностических и профилактических препаратов.

Целью проведенных нами исследований являлось изучение иммунобиологических свойств экспериментальной серии культуральной инактивированной вакцины против ящура, изготовленной с использованием полевого штамма типа Азия-1.

Материалы и методы исследований В научно-исследовательских работах использован выделенный на территории Казахстана и адаптированный к перевиваемой линии культур клеток ВНК-21/13 штамм «№13/КазНИВИ» типа Азия-1.

Для получения биологической массы полевого штамма использовалась перевиваемая культура клеток ВНК-21/13. Штамм репродуцировали в 3-х литровых роллерных стеклянных сосудах. Культивирование вируса проводили следующим образом: на питательной среде Игла-МЕМ на растворе Хенкса, в роллерные сосуды со сформировавшимся монослоем вносили свежую порцию поддерживающей среды без сыворотки и вирусный материал в дозе 0,01 ТЦД_{кл.} Инфицированные культуры выращивали на роллерном аппарате при 12 об/ч в термальной комнате при температуре 37° С до проявления признаков цитопатогенного действия на 80-90% площади монослоя клеток (ЦПД). Пораженные сосуды замораживали при температуре минус 20 °С и размораживали при комнатной температуре, затем вирусную суспензию объединяли в один емкость и брали пробы для определения биологической активности и стерильности. Титр вируса выражали в Ig ТЦД_{50/мл} и рассчитывали по Риду и Менча.

Очистку биологической массы полевого штамма проводили 2% хлороформом с последующей центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 мин.

Инактивацию вирусной суспензии серотипа Азия-1 проводили при температуре 25°С димером этиленимина в течении 30 часов.

Авирулентность вирусосодержащей суспензии проверяли методом инфицирования перевиваемой линии клеток ВНК-21 суточного возраста в течение трех последовательных пассажей.

После получения отрицательных результатов на контаминацию посторонней микрофлорой и результатов авирулентности вирусосодержащую суспензию делили на две части: первую часть суспензии сорбировали гелью гидрата окиси алюминия, а другую смешивали с масляным адьювантом ISA-206 согласно протоколу по применению. После отстаивания в течение 24 часов вакцину считали готовой к применению.

В эксперименте по изучению иммуногенеза индуцируемой адсорбат вакциной и эмульгированной вакцинами использовали интактных взрослых морских свинок массой не менее 600-700 г. Животных иммунизировали внутримышечно в дозе 2 см³ по 1 мл в задние ноги. Через определенный промежуток времени у вакцинированных животных брали пробы крови для определения динамики образования специфических антител против возбудителя ящура в серологических реакциях связывания комплемента (РСК), преципитации (РДП) и нейтрализации (РН).

Постановка и учет результатов серологических реакций проводили согласно методическим указаниям.

Результаты исследований и их обсуждение При изучении иммунобиологических свойств инактивированной эмульгированной культуральной вакцины против ящура типа Азия-1 основными критериями показателя эффективности разработанной вакцины служили сроки индуцирования иммунитета, его напряженность и продолжительность. Иммунобиологические свойства эмульгированной вакцины изучали в сравнении с таковыми классической гидроокись алюминиевой вакцины (ГОА-вакцина) против ящура серотипа Азия-1.

Морских свинок делили на группы по три в каждой, для проверки сроков наступления и напряженности иммунитета, одну группу животных оставляли контрольной. Через 5, 10, 14 и 21 сутки после иммунизации, у животных брали пробы крови для определения уровня комплементсвязывающих, преципитирующих и вируснейтрализующих антител против полевого штамма серотипа Азия-1 вируса ящура. Для определения напряженности иммунитета на 14 и 21 сутки после введения препарата проводили контрольное заражение вирулентным вирусом данного типа. Результаты проведенных исследований представлены на таблице 1.

Таблица 1 – Титры комплементсвязывающих антител у морских свинок, привитых инактивированной культуральной ГОА- и эмульгированной вакцинами против ящура типАзия-1

Типы вакцин	Титры комплементсвязывающих антител через сут.			
	5	10	14	21
Эмульгированная	Ц	1:4	1:8	1:32
Сорбированная	Ц	1:2	1:4	1:16

Данные представленные в таблице свидетельствует о том, что использованные противоящурные вакцины у морских свинок индуцировали образование специфических антител против возбудителя ящура к типу Азия-1 на 5 сутки после иммунизации. В вышеуказанные сроки установлены комплементсвязывающие антитела в пробах цельной сыворотки. На 10 и 14 сутки после вакцинации в сыворотках крови лабораторных животных титр специфических антител повысился на один порядок и составил от 1:2 до 1:8 постепенно повышался. Через 21 сутки после иммунизации в группе животных, привитых эмульгированной вакциной титры типоспецифических антител равнялась 1:32, тогда как у животных вакцинированных сорбированным препаратом уровень антител не превысил 1:16.

У вакцинированных животных в течение наблюдаемого срока каких-либо патологических изменений в общем состоянии не отмечено, но в точках инъекций вакцины установлены плотные инфильтраты, которые в начале давали местную температурную реакцию, а затем рассасывались. Общее состояние животных были удовлетворительным, и температура тела оставалась на уровне физиологической нормы.

При оценке иммуногенной активности противоящурных вакцин и поствакцинального иммунитета определение уровня преципитирующих антител имеет одно из ключевых значений. При проведении массовых исследований животных определение содержания специфических антител в их сыворотки крови является одним из простых и достоверных способов методов диагностики ящура. В этой связи в процессе проведения экспериментов, нами изучена иммуностимулирующие активности сорбированной и эмульгированной вакцин и их влияние на динамику образования преципитирующих антител. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Титры преципитирующих антител у морских свинок, привитых инактивированными культуральными вакцинами против ящура типа Азия-1

Виды вакцин	Титры преципитирующих антител через сут.			
	5	10	14	21
Эмульгированная	Ц	1:2	1:8	1:16
Сорбированное	Ц	Ц	1:2	1:8

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что у морских свинок, иммунизированных противоящурными препаратами, на 5 сутки линии взаимодействия преципитирующих антител и специфического антигена установлены только в цельных пробах. В пробах сывороток, полученных на 10 и 14 сутки, титр антител повысилась до 1:8, а на 21 сутки до 1:16.

На следующем этапе исследований изучено влияние сорбированной и эмульгированной вакцин на процесс образования вируснейтрализующих антител против возбудителя ящура типу Азия-1. Данные антитела активно участвуют при нейтрализации возбудителя инфекции и являются важными показателями иммуногенной активности инактивированной вакцины против ящура. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Титры вируснейтрализующих антител у морских свинок, привитых культуральными вакцинами против ящура типа Азия-1

Типы вируса ящура	Титры вируснейтрализующих антител через сут.			
	5	10	14	21
Эмульгированная	1:2	1:8	1:16	1:32
Сорбированная	Ц	1:2	1:4	1:8

В таблице 3 продемонстрированы результаты оценки иммуногенной активности моновалентных сорбированной и эмульгированной вакцин изготовленных из гомологичного штамма Азия-1 на лабораторных животных. Препараты активно индуцировали образование вируснейтрализующих антител против типоспецифического антигена вируса. В реакции нейтрализации специфические антитела были обнаружены на 5 день после прививки в разведении 1:2, далее титры антител повышались и на 21 сутки после иммунизации их уровень находился в пределах от 1:16 до 1:32.

Результаты изучения динамики накопления специфических антител в серологических тестах показали, что после введения животным инактивированных вакцин в их организме активно происходит интенсивная коррекция иммунной системы - антитела накапливаются в достаточно высоком уровне. Для оценки напряженности иммунитета привитых животных подвергали контрольному инфицированию вирулентным штаммом серотипа Азия-1, гомологичной вакцинному, на 14 и 21 сутки в дозе 10^4 ИД_{50/01см³ после вакцинации. Результаты исследования представлены в таблице 4.}

Таблица 4 – Результаты контрольного заражения морских свинок, привитых опытными вакцинами.

Противоящурные вакцины	Сроки контрольного заражения животных, сут.			
	14	Контрольная группа	21	Контрольная группа
Эмульгированная	3/0	3/3	3/0	3/3
Сорбированная	3/1	3/3	3/0	3/3
Примечания: 1 – в числителе - количество животных, взятых в опыт; 2 – в знаменателе - количество заболевших животных.				

Данные, приведенные в таблице 4, показывают, что различные типы инактивированных вакцин против ящура активно стимулируют образование противовирусного иммунитета и обеспечивают невосприимчивость привитых животных к заболеванию. При контрольном заражении иммунных животных через 14 суток после иммунизации, ГОА-вакцина предохраняет от вирулентного вируса 88,8% иммунизированных животных. Животные, привитые масляной вакциной были невосприимчивыми эпизоотическому штамму серотипа Азия-1 в 100% случаях. Результаты эксперимента инфицирования вакцинированных и контрольной групп морских свинок (на 21 сутки) показали, что обе вакцины активно индуцировали достаточный уровень вируснейтрализующих антител против серотипа Азия-1, что обеспечивало напряженный иммунитет против вируса ящура серотипа Азия-1. У морских свинок контрольной группы на 4-5 сутки после инъекции вирулентного вируса отмечено развитие характерных клинических симптомов ящура и генерализованной формы болезни.

Выводы Проведенные исследования показали, что культуральные инактивированные вакцины, изготовленные с использованием эпизоотического изолята вируса ящура типа Азия-1, выделенного во время вспышек ящура в 2004 г. в южных регионах страны обладают высокой проективной активностью и создают невосприимчивость у 88,8% животных на 14 сутки после иммунизации. Адьюванты ГОА и ISA-206 усиливают и активно пролонгируют иммуногенез против вирусных белков.

Литература

1. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б.В. и др. Вирусные болезни животных. - М.: ВНИТИБП, 1998. С. 532–548.
2. Бурдов А.Н., Дудников А.И., Малярец П.В. и др. Ящур.-М.: Агропромиздат, 1990. 320 с.
3. Муминов Д.М., Фомина Т.А., Егорова А.И. и др. Характеристика изолята вируса ящура типа Азия-1, выявленного в Таджикистане в 2004 году Пробл. мониторинга и генодиагн. инфекц. болезней ж-ных // Матер.международ. науч. конф. молодых ученых.-г. Владимир, 24–26 марта 2004.- С. 8–12.
4. Valarcher J.F., Ferris N., Knowles N.J. et al. Annual OIE/FAO FMD reference laboratory network report // January-November, 2005. 32 p.
5. Control of Infectious Animal Disease by Vaccination: Proc. Conf. Buenos Aires, 13–16 April 2004 /ed. A. Schudel, M. Lombard. Basel etc.: Karger, 2004. 515 p.
6. Фомина Т.А., Спиринов В.К., Щербачев А.В. и др. Результаты изучения иммунобиологических свойств эпизоотических штаммов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в Закавказье Актуал. пробл. инфекц. патологии ж-ных// Матер. междунар. науч. конф., посвящен. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ.-г. Владимир, 2003. С. 32–34.
7. Жильцова М.В., Изучение репродуктивных свойств изолятов вируса ящура типа Азия-1, выделенных в России во время вспышек в 2005-2006 гг., // Ветеринарная Патология. 2006.- №4.-С. 31-34.
8. Фомина С.Н., Комплексное изучение антигенного родства штаммов вируса ящура типа Азия-1// Ветеринарная Патология. 2006. №4.С. 34-37.
9. <http://www.oie.int>.

Абишов А.А.

АУСЫЛ ҚОЗДЫРҒЫШЫНЫҢ АЗИЯ-1 СЕРОТИПНЕ ҚАРСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛДЫ ИНАКТИВТЕНДІРІЛГЕН КУЛЬТУРАЛДЫ ВАКЦИНАСЫНЫҢ ПРОТЕКТИВТІК ҚАСИЕТТЕРІ

Мақалада аусыл індетіне қарсы моновалентті эмульгендірілген вакцинаның белсенділігі теңіз шошқаларындағы зерттеу нәтижесі көрсетілген. Аусыл індетіне қарсы егілген вакцинаның иммуногендік белсенділігі комплемент байланыстыру, преципитациялау және вирус бейтараптау антиденелерінің түзілу жолын анықтау арқылы, жануарлардың індет қоздырғышына қарсы тұру қабілеті Азия-1 типінің ұйытты штаммымен зарарлау арқылы анықталды.

Кілт сөздер: аусыл, антидене, ВНК-21/13 қайта себілетін жасушалар өсіндісі, серотип.

Abisov A.A.

PROTECTIVE PROPERTIES OF EXPERIMENTAL INACTIVATED CULTURED VACCINES AGAINST SEROTYPES 1 ASIA-MOUTH DISEASE VIRUS

The article presents the results of a study of monovalent emulsified protective activity of vaccine in guinea pigs. The terms of the formation of stress immunity after vaccination against foot and mouth disease on the basis of determining the dynamics of the formation of complement, and precipitating antibodies virusneutraliziruyuschih and challenge with virulent type Asia -1.

Keywords: aphthae, foot and mouth disease, antibodies, continuous cell cultures BHK-21/13 serotype.