

(ознакомительный фрагмент)

На правах рукописи

Бородина Ольга Владимировна

**РАЗРАБОТКА
ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНЫ
ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА ПТИЦ**

03.00.07 – микробиология

03.00.23 – биотехнология

Автореферат
диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов - 2005

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор

ВАСИЛЬЕВ Дмитрий Аркадьевич
доктор биологических наук, старший
научный сотрудник

ПРУНТОВА Ольга Владиславовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор

ШВИДЕНКО Инна Григорьевна

доктор биологических наук

ТИХОМИРОВА Елена Ивановна

Ведущая организация: Федеральное Государственное Учреждение “Федеральный

центр токсикологической и радиационной безопасности
животных” (ФГУ ФЦТРБ - ВНИВИ) г.Казань

Защита диссертации состоится “17” ноября 2005 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 220.061 04 при Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова” по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО “Саратовский государственный аграрный университет им Вавилова” по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335.

Автореферат разослан “13” октября 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

 Л.В Карпунина

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Пастереллез – одна из важнейших ветеринарных проблем. Заболевание у птиц вызывают различные сероварианты пастерелл серогруппы А. Значительный экономический ущерб, наносимый птицеводству этой инфекцией, складывается из высокого отхода поголовья, снижения привесов и затрат на проведение профилактических мероприятий (Душук, 1987; Rimler, Rhoades, 1989, Confer, 1993; Селиверстов, 2003).

Как показывает мировой опыт, вакцинация во многих случаях является одним из основных средств борьбы с инфекционными болезнями животных.

В настоящее время в арсенале иммунопрофилактики пастереллеза птиц имеется целый ряд вакцинных препаратов, различающихся по составу, технологии производства, способу применения и эффективности (Schimmel, Winnefeld, 1998; Levings, Henderson, Metz, 1993; Ярцев, 1996).

Важным моментом в технологии изготовления вакцин из убитых возбудителей является инактивация микроорганизмов. Для этих целей чаще всего используют формалин. Однако установлено, что формалин не является идеальным инактивантом, так как он может снижать антигенную и иммуногенную активность бактериальных антигенов. Поэтому необходим поиск новых инактивантов, которые не оказывают влияния на протективные антигены.

Одним из возможных решений этого вопроса может быть использование азиридинов.

Большинство вакцин против пастереллеза птиц выпускают в виде инаktivированных формалином сорбированных и эмульсионных препаратов. Основными недостатками сорбированных вакцин являются:

- необходимость многократных инъекций препарата;
- относительно большие дозы вакцин.

Применяемые в настоящее время эмульсионные вакцинные препараты превосходят по иммуногенности сорбированные, однако основным препятствием их широкого использования являются:

- 1) высокая вязкость, затрудняющая их введение при массовой обработке птицы;
- 2) высокая реактогенность.

Поэтому проведение работ по созданию новых инаktivированных вакцин против пастереллеза птиц является актуальной задачей, имеющей научное и практическое значение.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы являлась разработка трехвалентной инаktivированной эмульсионной вакцины против пастереллеза птиц.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

разработать режим инаktivации пастерелл аминоктилэтиленимином;

подобрать масляный адъювант и изготовить экспериментальные образцы вакцины против пастереллеза птиц;

разработать метод оценки иммуногенной активности противопастереллезной вакцины по индексу защиты (N);

определить иммунизирующую дозу, напряженность и продолжительность иммунитета после применения вакцины на курах.

Научная новизна работы. Новизна исследований состоит в том, что в результате проведенных экспериментов:

разработан режим и определены оптимальные параметры инаktivации пастерелл аминоктилэтиленимином;

количественно охарактеризована зависимость кинетики инаktivации пастерелл от концентрации инаktivанта;

установлена высокая антигенная и иммуногенная активность пастерелл, инаktivированных аминоктилэтиленимином;

разработан метод оценки иммуногенной активности противопастереллезной вакцины по индексу защиты (N).

Практическая значимость работы.

На основании полученных результатов разработана нормативно-техническая документация по изготовлению и контролю трехвалентной инаktivированной эмульсионной вакцины против пастереллеза птиц, утвержденная заместителем директора ФГУ ВНИИЗЖ по НИР 20.07.2005 г.

Апробация работы. Основные материалы исследований по диссертационной работе доложены и обсуждены на.

- Международной научно-практической конференции “Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов”, Покров, 24-26 сентября 2003 г.
- Международной научной конференции молодых ученых “Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных”, Владимир, 24-26 марта 2004 г.
- Всероссийской научно-практической конференции “Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы”, Ульяновск, 26-28 апреля 2005 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ.

Основные положения, выносимые на защиту:

Способ инаktivации пастерелл АЭЭИ.

Масляный адъювант для изготовления вакцины.

Вакцина против пастереллеза птиц, трехвалентная инактивированная эмульсионная.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 121 странице и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты исследований, обсуждение, выводы, практические предложения. Список использованных литературных источников включает 204 наименования, в том числе 107 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 19 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

Автор благодарит сотрудников кафедры микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы пищевых продуктов Ульяновской ГСХА, лаборатории экологии ГНУ ВНИИВВиМ и лаборатории микробиологии ФГУ ВНИИЗЖ за помощь в выполнении данной работы

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штаммы *Pasteurella multocida* №115 (серовар А:1), №1231(серовар А:3), ВК-3(серовар А:4); полученные из музея бактериальных культур ФГУ ВГНКИ (г. Москва), №11039 (серовар А.1) и №15742 (серовар А:3), полученные из американской коллекции типовых культур (АТСС).

Питательные среды, краски. При проведении исследований применяли общепринятые питательные среды и краски. Для культивирования пастерелл использовали питательную среду на основе мясного перевара по Хоттингеру.

Подопытные животные. Для контроля безвредности и реактогенности вакцины использованы мыши белые нелинейные массой 16-18 г. Для определения вирулентности пастерелл, оценки антигенных и иммуногенных свойств вакцины - мыши белые нелинейные массой 20-22 г и куры породы белый леггорн в возрасте от 25 суток до 3 месяцев.

Культивирование пастерелл проводили в аппаратах АК-210 объемом 10 литров. Культуры в реакторах выращивали 8 часов при температуре $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ с постоянным перемешиванием 800-1200 об/мин и непрерывной аэрацией из расчета обогащения одного литра питательной среды воздухом в соотношении 1:2. В процессе культивирования определяли pH среды, чистоту роста и концентрацию микробных клеток. При изменении pH среды в щелочную сторону в реактор добавляли стерильный 40 % раствор глюкозы до 0.1-0.2 % содержания (сухой) глюкозы в среде. Культивирование прекращали, когда концентрация микробов переставала заметно увеличиваться. Выращенные культуры охлаждали до температуры $10-15^{\circ}\text{C}$ и использовали в дальнейшей работе.

Проведение инактивации. Отработку режима инактивации пастерелл аминоктилэтиленимином проводили со штаммом *Pasteurella multocida* ВК-3. АЭЭИ вносили в бактериальную суспензию, исходя из концентрации бактерий в определенном объеме, а также процентного содержания основного активного вещества в водном растворе инактиванта. Предварительно рН АЭЭИ доводили 5 М раствором уксусной кислоты до 7.4-7.8.

Определение числа живых микроорганизмов. Для подсчета живых микроорганизмов в суспензии использовали метод определения количества КОЕ высевом на плотные питательные среды.

Определение концентрации инактиванта (K_{50}), обеспечивающей гибель 50 % микробных клеток популяции. В точно отмеренные объемы бактериальной суспензии, с концентрацией 10 млрд м.к./см³ по стандарту мутности, добавляли 0.25 % АЭЭИ и далее количество АЭЭИ увеличивали, получая его двукратно возрастающие конечные концентрации. Через каждые 3 часа, начиная с 1 часа инкубации при 37° С, в образцах определяли число живых микробов K_{50} рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина: $IgK_{50} = IgK_n - \delta(\Sigma li - 0.5)$, где K_n – максимальная концентрация инактиванта в бактериальной суспензии, при которой отсутствует рост микробов на всех чашках с МПА, δ – логарифм кратности испытанных концентраций инактиванта, li – отношение количества чашек с характерным бактериальным ростом к общему числу засеянных чашек с МПА, Σ – сумма значений li для всех испытанных концентраций инактиванта.

О вирулентности штаммов пастерелл для мышей и кур судили по LD_{50} и выражали в КОЕ/мл

Белых мышей заражали подкожно, а кур – внутримышечно в объёме 0.5 см³ десятикратными разведениями (10^{-1} - 10^{-9}) суточных бульонных культур пастерелл в забуференном физиологическом растворе.

Электронная микроскопия. Нативные и инаktivированные бактерии просматривали и фотографировали на электронном микроскопе JEM-100 при увеличении 1600 раз. Предварительно бактериальные клетки освобождали от остатков культуральной среды и инактиванта трехкратным центрифугированием (3000 об/мин 30 минут) с последующим ресуспендированием в фосфатно-буферном растворе (ФБР). Контрастирование препаратов проводили 4 % фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК) рН 6.8.

Определение реактогенности адьювантов. В работе использовали следующие масляные адьюванты: полный адьювант Фрейнда (ПАФ), адьювант ВНИИЗЖ (на основе минерального масла Marcol-52 с эмульгатором Е-139) и Montanide ISA-70. Реактогенность адьювантов определяли на белых мышах по методу Гарцета в модификации Е.В. Гусевой,

А.И. Дудникова (1986). Для этого простерилизованные препараты вводили в подушечку правой задней лапки мыши в дозе $0,025 \text{ см}^3$ (по 10 мышей на каждый адъювант). В качестве контроля использовали стерильный физиологический раствор. Спустя 10-14 суток, мышей убивали, отсекали задние лапки по скакательный сустав и взвешивали отдельно правые (инъектированные) и левые (интактные). Индекс реактогенности K определяли по формуле: $K = (\Sigma M' / \Sigma M - 1) \times 100\%$, где $\Sigma M'$ - сумма веса правых лапок; ΣM - сумма веса левых лапок.

Изготовление опытных образцов вакцины. Для изготовления опытных образцов вакцины использовали суспензию пастерелл трех сероваров инактивированных аминоктилэтиленимином. Составление опытных образцов вакцины проводили с таким расчетом, чтобы в 10 см^3 готовой вакцины содержалось по 10^{10} м.к. бактерий каждого серовара. Освобожденные от культуральной среды и инактиванта центрифугированием (на проточной центрифуге), ресуспендированные в забуференном физрастворе до необходимой концентрации антигены пастерелл смешивали и эмульгировали с различными объемами масляных адъювантов на микроразмельчителе тканей РТ-2 при 3000 об/мин в течение 5 минут. Образцы готовили в соотношении антиген-адъювант. 20:80, 30:70, 40:60 и 50:50. Полученную вакцину расфасовывали во флаконы.

Определение физических и иммунобиологических свойств опытных образцов вакцины

Стабильность вакцины определяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин, а также двухнедельной выдержкой в термостате при 37°C и длительным хранением при температурах $18-22^{\circ}\text{C}$ и $2-8^{\circ}\text{C}$ с последующей визуальной оценкой на предмет расслоения эмульсии.

Кинематическую вязкость измеряли капиллярным вискозиметром марки ВПЖ-2 и выражали в мм/сек. Определение вязкости проводили при температуре вакцины 20°C , измеряя время истечения вакцины от первого до второго мениска с точностью 0.2 сек. Кинематическую вязкость определяли по формуле. $V = C \Gamma$, где V – кинематическая вязкость, $\text{мм}^2/\text{сек}$; C – постоянная вискозиметра; Γ – средняя арифметическая времени истечения вакцины, ссек.

Определение стерильности готовой вакцины и полноты инактивации бактериальных суспензий проводили в соответствии с ГОСТом 28085-90 “Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности”.

Безвредность вакцины определяли по ОСТ 9380-076-00008064-96 “Препараты ветеринарные. Методы определения безвредности. Основные положения”. Белым мышам и курам препарат вводили однократно, в дозе в 3 раза превышающей иммунизирующую дозу.

Реактогенность вакцины определяли на курах путем двукратной инъекции прививной дозы препарата с интервалом между введениями 20 суток. За птицей вели наблюдение в течение 7 суток после первой и второй вакцинации, проводя ежедневную оценку клинического состояния и наличие тканевых реакций в месте введения препарата.

Иммуногенность вакцины изучали в опытах на белых мышах и курах. Животных иммунизировали однократно цельной вакциной и разведениями в масляном адьюванте, используя трехкратный шаг. Через 21 сутки после вакцинации всех иммунизированных и контрольных (не вакцинированных) животных заражали минимальными летальными дозами штаммов гомологичных сероваров. Результаты опытов учитывали в течение 10 сут после заражения и оценивали по величине ImD_{50} , которую определяли по формуле Кербера в модификации Ашмарина и выражали в объёмных единицах ($см^3$) и количеством инактивированных микробных клеток, находящихся в этом объеме.

Антигенную активность вакцины оценивали по способности препарата вызывать у привитых птиц выработку антител к возбудителю заболевания. Для этого вакцину вводили цыплятам в объёме $0,5 см^3$ в область грудных мышц. Через 20 суток проводили ревакцинацию. На 21 сутки после второй вакцинации у всех цыплят отбирали кровь и сыворотки исследовали иммуноферментным методом на наличие антител.

Статистическая обработка результатов

При анализе и обобщении результатов исследований были использованы статистические методы, описанные И.П. Ашмариным, А.А. Воробьевым (1962), Н.Бейли (1962).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение биомассы пастерелл для изготовления вакцины

Первый этап нашей работы был посвящен изучению биологических свойств контрольно-производственных штаммов пастерелл. При изучении культуральных свойств штаммов *P. multocida* посевы инкубировали при температуре $37^{\circ}C$ до 72 часов. Через 18-24 часа культивирования наблюдали незначительное равномерное помутнение бульона с образованием "муаровых волн" при встряхивании. Через 48-72 часа отмечали просветление МПБ с образованием слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде "косички".

На агаре по Хоттингеру через 18-24 часа культивирования отмечали наличие мелких, прозрачных, росинчатых, гладких колоний.

На МППА рост культуры пастерелл происходил по уколу в виде беловатого стержня, окружающая среда при этом оставалась прозрачной.

Производственные испытания вакцины

При проверке противозпизоотической эффективности экспериментальных серий инактивированной эмульсионной противопастереллезной вакцины было привито - 25000 голов, в том числе цыплят 28 суточного возраста – 5000 голов и 20000 голов 40 суточного возраста.

Вакцина была применена на птицефабрике “Русь” Курской области (хозяйство неблагополучное по пастереллезу). Препарат вводили подкожно в область шеи в объеме 0.5 см³ двукратно с интервалом 40 суток.

Среди вакцинированного поголовья птицы случаев заболевания пастереллезом на протяжении 6 месяцев не зарегистрировано.

Таким образом, результаты производственных испытаний разработанной инактивированной эмульсионной вакцины против пастереллеза птиц показали, что вакцина безвредна, слабореактогенна и обладает высокой эффективностью.

ВЫВОДЫ

Установлено, что аминоктилэтиленимин в концентрации 1% полностью инактивирует бактерии *Pasteurella multocida*.

Количественные оценки кинетики выживаемости пастерелл под воздействием аминоктилэтиленимина позволили описать её в виде формулы экспоненты, определить константы скорости инактивации и прогнозировать время инактивации до допустимого уровня в зависимости от объема суспензии и концентрации бактерий.

Установлено, что масляный адъювант Montanide ISA-70 обладает умеренной реактогенностью при использовании его в составе вакцины против пастереллеза птиц.

Объемное соотношение суспензии бактериального антигена и адъюванта 30:70 обеспечивает образование стойкой эмульсии типа “вода-масло” с кинематической вязкостью 70.6 мм²/сек при температуре 20° С.

Показано, что величина ImD_{50} инактивированных пастереллезных бактерий в составе вакцины для кур составляет по серовару А:1- 0.018 см³ (3 $\times 10^7$ м.к.), серовару А:3- 0.015 см³ (3.0 $\times 10^7$ м.к.), серовару А:4 – 0.020 см³ (4.0 $\times 10^7$ м.к.).

Для оценки иммуногенной активности противопастереллезной инактивированной эмульсионной вакцины наиболее информативным является количественный метод определения индекса защиты (N).

Однократная иммунизация кур разработанной вакциной обеспечивает защиту против пастереллеза продолжительностью 2 месяца. Двукратная вакцинация с интервалом 20 суток, создает напряженный иммунитет продолжительностью не менее 6 месяцев (срок наблюдения).

Изготовленные образцы противопастереллезной вакцины безвредны, обладают умеренной реактогенностью, в процессе хранения при температуре 2-8° С сохраняют исходную иммуногенную активность в течение года.

Практические предложения

Результаты экспериментальной работы использованы при разработке нормативно-технической документации по изготовлению и контролю биологического препарата "Вакцина против пастереллеза птиц трехвалентная инактивированная эмульсионная" (технические условия, наставление по применению, инструкция по изготовлению) Утверждена заместителем директора ФГУ ВНИИЗЖ по НИР 20.07.2005г.

Список научных работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Русалеев В.С., Прунтова О.В., Гневашев В.М., Селиверстов В.В., Потехин А.В., Колотилова Т.Г., Бородин О.В. Разработка вакцины против пастереллеза птиц инактивированной эмульсионной //Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов. Тр. Междунар науч.-практич.конф.-Покров, 2003.-Ч.2.-С 514-519.
2. Шадрова Н.Б., Бородин О.В. Разработка иммуноферментного набора для выявления антител в сыворотках крови кур к *Pasteurella multocida* // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: Матер междунар.науч конф молодых ученых.-Владимир, 2004.-С. 136-139.
3. Русалеев В.С., Прунтова О.В., Гневашев В.М., Потехин А.В., Васильев Д.А., Бородин О.В. Оценка иммуногенности противопастереллезной вакцины// Труды Федерального центра охраны здоровья животных - Владимир,2005.-Т III -С. 223-229
4. Васильев Д.А., Бородин О.В., Прунтова О.В. Проблемы пастереллезной инфекции// Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы. Матер.Всерос.науч.-практич.конф -Ульяновск, 2005 -С. 200-206.
5. Бородин О.В., Прунтова О.В., Васильев Д.А. Сравнительное испытание димера этиленимина и формалина при инаktivации бактерий *Pasteurella multocida* // Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы: Матер Всерос.науч.-практич конф.-Ульяновск, 2005.-С. 207-210.