

На правах рукописи

Шарыпов Андрей Сергеевич

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ
ЭМУЛЬСИОННОЙ ПРОТИВОЯЩУРНОЙ ВАКЦИНЫ**

**06.02.02. – «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология»**

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук**

Владимир 2019

**Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)**

Научный руководитель: **Лозовой Дмитрий Анатольевич**
кандидат ветеринарных наук

Официальные оппоненты: **Гринь Светлана Анатольевна** член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, ВРИО директора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Капустина Ольга Владимировна, доктор ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБНУ "Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук"

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

Защита состоится 1 октября 2019 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, мкр. Юрьевец). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2019 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы

Ящур - острое контагиозное вирусное заболевание домашних и диких парнокопытных и мозолоногих животных. Для него характерна тенденция к широкому распространению и эпизоотическому течению. Эпизоотии ящура не знают географических и климатических границ и могут распространяться в очень короткое время на огромные территории. Как известно, ящур, в соответствии с современной международной классификацией, включен МЭБ в список болезней, подлежащих обязательной нотификации [5].

На сегодняшний день для вакцинопрофилактики ящура используют вакцины двух типов – сорбированные и эмульсионные.

Для изготовления противоящурных вакцин необходимо применение адъювантных веществ, обеспечивающих эффективную иммунизацию при наименьшем количестве антигена. При производстве вакцин против ящура в качестве адъювантов используют гель гидроокиси алюминия и сапонин в сорбированных вакцинах и масляные адъюванты - в эмульсионных. Поскольку сорбированные вакцины оказались неэффективны при вакцинопрофилактике свиней, то наиболее перспективными являются эмульсионные вакцины, формирующие более напряженный и продолжительный иммунитет у КРС, МРС и свиней [1].

Несмотря на ряд преимуществ, которыми обладают вакцины с масляным адъювантом им присущи недостатки, требующие своего разрешения. Поэтому дальнейшее совершенствование эмульсионных вакцин, схем их применения, и разработка новых масляных адъювантов является актуальной задачей.

1.2. Степень разработанности проблемы

Работами отечественных и зарубежных исследователей показана эффективность использования эмульсионных вакцин для профилактики и борьбы с ящуром. Для изготовления эмульсионных противоящурных вакцин используют масляные адъюванты – комплекс веществ, который способствует усилению иммунного ответа, но вызывает ряд нежелательных воспалительных реакций в месте введения препарата. Современные вакцинные препараты требуют доработки в части усовершенствования адъювантных веществ [6].

В Российской Федерации эмульсионные вакцины против вируса ящура готовят с использованием масляных адъювантов фирмы «Seppic» Франция.

Разработка новых адъювантов для эмульсионных противоящурных вакцин с использованием отечественных компонентов является первоочередной задачей исследований.

1.3. Цель и задачи исследования

Основной целью наших исследований являлось сравнительное изучение масляных адъювантов для изготовления эффективных противоящурных вакцин.

Для достижения основной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить реактогенность и пирогенность отечественных белых масел (производитель - объединенный центр исследований и разработок ООО «РН-ЦИР») на лабораторных животных;
- изготовить экспериментальные образцы вакцин на основе отечественных белых масел;
- провести оценку стабильности и реактогенности экспериментальных образцов эмульсионных вакцин, изготовленных на основе белых масел;
- провести сравнение вакцин, изготовленных на основе масляных адъювантов Montanide ISA-61, ISA-206 и БМ 1.4.139;
- изучить влияние способа введения эмульсионных вакцин на иммуногенную активность;
- изучить сохраняемость 146S компонентов вируса ящура (ВЯ) в эмульсионных вакцинах в процессе хранения.

1.4. Научная новизна состоит в том, что:

- изучены белые масла отечественного производства, пригодные для изготовления эмульсионных вакцин;
- исследована эффективность нового адъюванта из отечественных компонентов, изготовлен и испытан экспериментальный образец эмульсионной вакцины;
- определена эффективность адъюванта Montanide ISA-61 в составе эмульсионных вакцин против ящура;
- сравнены по эффективности различные способы введения эмульсионных вакцин в организм животных;
- изучена сохраняемость 146S компонента ВЯ в составе экспериментальных образцов эмульсионных вакцин в процессе хранения.

1.5. Практическое значение работы

Получен Патент RU 2 652 889 C1, 03.05.2018 Бюл. № 13. «Способ изготовления вакцины инактивированной эмульсионной против ящура и вакцина инактивированная эмульсионная против ящура».

Полученные результаты вошли в СТО 00495527-0143-2018 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

1.6. Методология и методы исследований

В работе использованы вирусологические, серологические и иммунологические методы исследований с использованием клеточных культур (КК), лабораторных и естественно – восприимчивых к ящуру животных.

1.7. Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты изучения свойств белых масел на возможность использования их в составе масляного адьюванта при изготовлении противоящурных вакцин;
- результаты изучения реактогенности, стимулирующих и эмульгирующих свойств белых масел отечественного производства;
- результаты исследований свойств масляных адьювантов Montanide ISA-61, ISA-206 и БМ 1.4.139 на лабораторных и естественно - восприимчивых животных;
- результаты исследований реактогенности и иммуногенности эмульсионных вакцин с различными адьювантами;
- результаты оценки методов введения эмульсионных вакцин;
- результаты изучения сохраняемости антигенов в составе эмульсионных вакцин.

1.8. Личный вклад соискателя.

Диссертация выполнена автором самостоятельно. Автор выражает благодарность за содействие в выполнении работы заведующему лабораторией профилактики ящура к.в.н. Михалишину Д.В., за консультативную помощь д.в.н., Михалишину В.В., а также за практическую помощь в выполнении отдельных этапов работы сотрудникам лаборатории профилактики ящура к.в.н. Старикову В.А., к.в.н. Борисову А.В., к.б.н. Гусевой М.Н.

1.9. Степень достоверности и апробации результатов.

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на заседаниях Учёного совета и методической комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» (2015 – 2019 гг.), на 1-й Международной конференции по ветеринарной иммунологии «Актуальные проблемы ветеринарной иммунологии» (ВИЭВ-2017 г.).

Достоверность проведённых исследований подтверждена результатами комиссионных испытаний и патентом на изобретение.

1.10. Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научные работы, в том числе 3 статьи в изданиях, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ для докторских и кандидатских диссертаций, а также получен патент на изобретение.

1.11. Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 101 странице компьютерного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, приложения; иллюстрирована 19 таблицами. Список использованной литературы включает 168 источников, из них 78 иностранных. В приложении представлены копии титульных листов документов, подтверждающих достоверность результатов работы, ее научную новизну и практическую значимость.

2. Собственные исследования

2.1. Материалы

Штаммы вируса ящура. А №2177/Амурский/2013, О №2212/Приморский/2014, А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013, О №2047/Саудовская Аравия, Азия-1 №1946/Шамир 3/89.

Животные. Белые мыши массой 18-20 г, кролики массой 1,5-2,0 кг. Естественно - восприимчивые животные из благополучных по ящуру зон: КРС массой 250-300 кг, овцы «Романовской» породы», 11-месячного возраста.

Культуры клеток. Первично-трипсинизированная культура клеток свиной почки (СП), перевиваемые линии клеток: ВНК-21-2/17, КК почки сирийского хомячка, суспензионная; ПСГК-30 - почка горного сибирского козерога.

Адьюванты. При изготовлении инактивированных вакцин использовали: гидроокись алюминия (ГОА) 3% концентрации, производство ФГБУ «ВНИИЗЖ»; сапонин фирмы «Мерк», Германия; масляные адьюванты Montanide ISA-70, ISA-61, ISA-206 фирмы «Seppic», Франция; образцы экспериментальных белых масел (производитель ООО «РН-ЦИР»): БМ 1.1, БМ 1.2, БМ 1.3, БМ 1.4, БМ 2.1, БМ 2.2; Marcol-52 – медицинское белое масло; эмульгатор - «продукт 139».

Растворы и реактивы. В работе использовали: фосфатно-буферный раствор 1/15М рН 7,4-7,6; 15-20%-й раствор аминоэтилэтиленимина (АЭЭИ); уксусную кислоту, ледяную, ХЧ, ГОСТ 61-75; хлороформ, ГОСТ 20015-88 или ТУ 6-09-4263-76; полисепт (полигексаметиленгуанидин (МЦ)), производства ПЗБ, г. Покров; полиэтиленгликоль (ПЭГ-115) м.м. 4500-6000 Ивано-Франковского завода, Украина; питательные среды: Игла; 0,5%-й раствор ГЛА на Эрла.

2.2. Методы

Количественное определение вирусного белка. Определение концентрации иммуногенных компонентов культурального вируса ящура: 146S, 75S частиц в антигеном материале, используемом в качестве сырья для

производства противоящурных вакцин осуществляли иммунохимическим методом по А.Ф. Бондаренко (1987 г.).

Определение инфекционной активности. Титрование вируса осуществляли на чувствительной первично-трипсинизированной культуре клеток СП. Расчет инфекционного титра вируса проводили по общепринятой методике Кербера и выражали в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Инактивация инфекционности вируса. Инактивацию инфекционности культурального вируса осуществляли АЭЭИ в концентрации 0,03-0,05% при температуре 37⁰С в течение 12 часов, рН 7,4-7,6.

Очистка вирусной суспензии. Для очистки вирусной суспензии от балластных примесей использовали раствор полигексаметиленгуанидина в конечной концентрации 0,007%. Флокулированные и нерастворимые примеси отделяли седиментацией с последующей декантацией осветлённой суспензии антигена.

Определение авирулентности препаратов. Авирулентность инактивированных препаратов определяли на монослойной клеточной культуре почки свиньи (СП).

Концентрирование антигена. Вирусный антиген концентрировали методами сорбции на ГОА, ультрафильтрацией, преципитацией полиэтиленгликолем.

Концентрирование ультрафильтрацией осуществляли на установке производства Владисарт. Кратность концентрирования составляла 5-20 раз по объему.

Реакция нейтрализации. Для определения титра вируснейтрализующих антител (ВНА) использовали реакцию нейтрализации (РН). Постановку РН осуществляли на первично-трипсинизированной культуре клеток СП по общепринятой методике с двукратным разведением исследуемых сывороток и постоянной дозой вируса соответствующего штамма (100 ТЦД₅₀).

Определение стерильности препаратов. Биологический контроль на стерильность питательных сред, суспензий КК, антигена и готовой вакцины осуществляли в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Изготовление эмульсионных вакцин. При изготовлении эмульсионной вакцины использовали инактивированную антигенсодержащую суспензию, которую концентрировали при помощи проточной ультрафильтрации или ПЭГ. Полученные концентраты антигена хранили при 2-8⁰С до изготовления образцов вакцины. В качестве адьюванта использовали Montanide ISA-70, ISA-206, ISA-61,

масляные адъюванты полученные при смешивании отечественных белых масел и эмульгатора «продукт 139». Эмульсии готовили при помощи гомогенизатора Silverson L5M. Концентраты антигенов и масляных адъювантов ISA-206, ISA-61 и БМ 1.1, БМ 1.2, БМ 1.3, БМ 1.4, БМ 2.1, БМ 2.2 диспергировали в соотношении 50:50 по массе, а ISA- 70 в соотношении 40:60.

Контроль иммуногенности вакцин. При определении иммуногенности вакцин руководствовались СТО 00495527-0143-2010 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)», СТО 00495527-0142-2010 «Вакцина против ящура эмульсионная моно- и поливалентная для профилактики ящура свиней (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

Определение авирулентности и безвредности вакцины. Контроль авирулентности противоящурной вакцины осуществляли согласно СТО 00495527-0143-2010 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)», СТО 00495527-0142-2010 «Вакцина против ящура эмульсионная моно- и поливалентная для профилактики ящура свиней (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

Определение стабильности эмульсионных вакцин. Пробы эмульсий хранили в стеклянных пробирках по 10 см³ при температурных режимах 2-8, 25 и 37°С. Препарат считали стабильным, если в течение 14 суток при температуре хранения 37°С он не отделял водную фазу на дне пробирки.

Оценку стабильности эмульсии проводили по величине различных фракций, полученных в процессе хранения, выраженных в процентах по отношению к эмульсии в первоначальном виде. Обозначение соответствующих фракций представляли в буквенном виде: А – прозрачное масло в верхней части эмульсионного столба, В – присутствие опалесцирующего масла, С – нормальная эмульсия, D – плотная эмульсия, Е – наличие водной фракции в нижней части эмульсионного столба.

Оценка реактогенности масел на лабораторных животных. Для определения реактогенности использовали белых мышей массой 18-20 г, которым в подушечку задней правой лапы вводили испытуемое масло в объеме 0,05 см³, а в подушечку левой задней лапы эталонный образец Marcol-52 в том же объеме для контроля. Через 10 суток после введения масла, предварительно усыпленным животным ампутировали задние лапы по голеностопному суставу и взвешивали на торсионных весах. Каждый образец испытуемого масла исследовали на 10 мышах.

Критерием оценки реактогенности (K_p , %) – считали изменение массы лап после инъекции испытуемых образцов относительно массы лап после инъекции

контрольного образца. Ниже представлена формула расчета коэффициента реактогенности:

$$K_p = \frac{x_0 - x_k}{x_k} \times 100\%,$$

где x_k и x_0 – средние арифметические массы лап после введения контрольного и испытуемого образцов масел, соответственно [3].

Определение пирогенности масел на лабораторных животных. Для определения пирогенности масел, использовали белых кроликов породы «Белый великан» массой 1,5-2,0 кг. Группам из 3-х кроликов вводили подкожно по 1,0 см³ испытуемого образца масел. Изменение температуры тела каждого животного определяли как разницу между максимальной (в течение 14 суток) и средней первоначальной температурой (за трое суток до введения масла). Сумма изменений температуры тела трех кроликов не должна превышать 1,15°С. Температура тела кролика в норме 38,5-39,5°С.

Статистическая обработка результатов исследований. Для статистической обработки результатов исследований использовали программу Microsoft Excel.

3. Результаты собственных исследований

3.1. Реактогенность и адьювантные свойства отечественных белых масел, входящих в состав масляных адьювантов.

Иммунологическая эффективность вакцинных препаратов зависит не только от качества самого антигена, но и от наличия неспецифических стимуляторов иммуногенеза – адьювантов. Эмульсионные вакцины представляют собой растворенный или суспендированный в воде антиген, который диспергируют в масляном адьюванте, состоящим из 95-96% белого масла и 4-5% эмульгатора. Входящие в состав масляного адьюванта минеральные масла в основном обуславливают реактогенность препарата. Чем менее реактогенное масло входит в состав адьюванта, тем менее выражены поражения в точке введения [4].

Минеральные масла, используемые для изготовления эмульсионных вакцин, должны быть высокоочищенными, свободными от ароматических углеводородов, состоять в основном из парафиновых и нафтеновых углеводородов. Масла должны иметь высокую термическую и химическую стабильность, нейтральное значение рН, низкую вязкость и температуру застывания. Масло, введенное в организм животного, должно быть безвредным, слабо или умеренно реактогенным, не обладать пирогенными, аллергическими и канцерогенными свойствами [2].

В опытах были использованы шесть образцов масел (БМ 1.1, БМ 1.2, БМ 1.3, БМ 1.4, БМ 2.1, БМ 2.2) предоставленные ООО «РН-ЦИР».

3.1.1. Оценка реактогенности масел на белых мышах

Таблица 1 - Исследование реактогенности образцов белых масел на мышах
(n=10)

Название масел	Масса конечностей белых мышей после введения, г		Коэффициент реактогенности, (Kp), %
	Испытуемого образца (x_0),	Эталонного образца Marcol-52 (x_k), г	
БМ 1.1	3,0	2,2	26
БМ 1.2	2,5	2,0	25
БМ 1.3	2,0	2,2	-9
БМ 1.4	1,5	2,0	-25
БМ 2.1	2,0	2,0	0
БМ 2.2	2,15	2,4	-10,4

Примечание: значение коэффициента реактогенности <24 – слабо реактогенные; от 25 до 49 – умеренно реактогенные; от 50 до 99 – выражено реактогенные; >100 – сильно реактогенные

Оценка реактогенности исследуемых образцов белых масел (таблица 1) показала, что образцы БМ 1.1 и БМ 1.2 были наиболее реактогенными, т.к. отек лап мышей превышал отек контрольного образца, т.е. коэффициент реактогенности положительный. Образец БМ 2.1 обладал такой же реактогенностью, как и контрольный образец (коэффициент реактогенности равен 0). Образцы БМ 1.3, БМ 1.4 и БМ 2.2 имели отрицательный коэффициент реактогенности, т.е. отек лап меньше, чем у контрольного образца.

Таким образом, из шести опытных образцов лучшим, по результатам исследований, оказался образец БМ 1.4, который обладал коэффициентом реактогенности (-25).

3.1.2. Определение пирогенности масел на кроликах

Работу проводили на кроликах массой 1,5-2,0 кг., из которых были сформированы 8 групп, по 3 головы в каждой: первую группу инокулировали образцом масла – БМ 1.1, вторую группу – БМ 1.2, третью группу – БМ 1.3, четвертую группу – БМ 1.4, пятую группу – БМ 2.1, шестую группу – БМ 2.2, седьмой группе вводили образец масла – Marcol - 52 (контрольное масло), восьмая группа – контроль без введения масел.

Результаты определения пирогенности белых масел на кроликах представлены в таблице 2.

По приведенным в таблице 2 данным видно, что повышение температуры тела в среднем по группе у кроликов, привитых БМ 1.1 и БМ 1.2 составила 0,2°C. У животных, которым вводили образцы масел БМ 1.3, БМ 1.4 и Marcol-52 - 0,1°C, а маслами БМ 2.1 и БМ 2.2 - 0,4°C.

Таблица 2 - Результаты исследования пирогенности масел на кроликах

(n=3)

№ группы	Средние значения температуры тела после введения масел (°С)									ΔТ, °С
	за 3 сут. до введения масла, °С	сутки								
		1	3	5	7	9	11	14	М	
1	38,9	39,1	38,6	38,5	38,6	38,7	38,7	38,8	38,7	0,2
2	39,2	39,2	38,5	38,5	38,4	38,6	38,7	38,7	39,0	0,2
3	39,2	39,2	39,0	38,9	38,8	38,7	38,6	38,8	39,1	0,1
4	38,8	38,9	38,6	38,5	38,4	38,4	38,3	38,3	38,7	0,1
5	38,9	39,3	38,9	39,0	38,8	38,7	38,6	38,6	38,5	0,4
6	38,8	39,2	38,9	38,9	38,7	38,8	38,7	38,6	38,4	0,4
7	38,9	38,9	38,8	38,7	38,7	38,8	38,9	38,8	38,9	0
8	38,8	38,7	38,6	38,7	38,6	38,7	38,7	38,8	38,7	-

Таким образом, в течение опыта температура тела у животных в среднем по группе не превышала 0,4°С, что указывает на апиrogenность исследуемых масел.

3.2. Изготовление масляных адьювантов

Для приготовления масляных адьювантов использовали образцы масел БМ 1.1, БМ 1.2, БМ 1.3, БМ 1.4, БМ 2.1, БМ 2.2 и эмульгатор «продукт 139».

Сначала производили взвешивание масел, затем добавляли эмульгатор «продукт 139» в количестве 4% по весу, тщательно перемешивали, стерилизовали в водяной бане в течение 30 минут после закипания воды, охлаждали до температуры 18-20°С и использовали в работе.

3.3. Изготовление эмульсионных вакцин

Образцы масляных адьювантов, приготовленные на основе масел БМ 1.1, БМ 1.2, БМ 1.3, БМ 1.4, БМ 2.1, БМ 2.2 и Montanide ISA-70 (контроль), смешивали с водным антигеном типа А №2177/Амурский/2013 и эмульгировали на гомогенизаторе Silverson L5M. Готовые вакцинные препараты были названы В-БМ 1.1, В-БМ 1.2, В-БМ 1.3, В-БМ 1.4, В-БМ 2.1, В-БМ 2.2.

Моновалентную эмульсионную вакцину против вируса А №2177/Амурский/2013 готовили в соотношении 60:40 (60%-масла, 40%-антиген) по весу, при комнатной температуре.

Эмульгирование проводили в течение 7 минут при 5000 об/мин. В результате получили эмульсию типа «вода-масло».

3.3.1. Контроль стабильности приготовленных образцов эмульсионных вакцин

Эмульсионные вакцины, приготовленные на предыдущем этапе, наливали в пробирки, отмечали высоту – 100 мм, и наблюдали во времени.

На этапе центрифугирования образцов эмульсии обнаружили отслоение водной фракции на дне пробирки в образцах В-БМ 1.1 и В-БМ 1.2.

Результаты определения стабильности моновалентных эмульсионных вакцин против вируса ящура тип А №2177/Амурский/2013 представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Стабильность моновалентных эмульсионных вакцин при различных температурных режимах хранения

Сутки наблюдения		Исследуемые эмульсионные вакцины				
		В-БМ 1.3	В-БМ 1.4	В-БМ 2.1	В-БМ 2.2	ISA-70 (контроль)
		высота отделенной фракции, мм				
		Е	Е	Е	Е	Е
Температура 2-8°С	3	-	-	0,5	-	-
	7	-	-	0,5	-	-
	14	-	-	0,5	-	-
	28	-	-	0,5	1	-
	60	-	-	0,5	1	-
	90	-	-	0,5	1	-
Температура 25°С	3	-	-	0,5	-	-
	7	-	-	0,5	-	1
	14	-	-	0,5	-	2
	28	-	-	0,5	0,5	3
	60	0,5	-	0,5	1	3
	90	0,5	-	0,5	1	4
Температура 37°С	3	-	-	0,5	-	-
	7	-	-	0,5	-	1
	14	-	-	0,5	-	2
	28	-	-	0,5	0,5	3
	60	0,5	-	0,5	1	3
	90	0,5	-	1	1	4

Примечание: Е – водная фракция на дне пробирки; «-» - фракция не обнаружена

У образца В-БМ 2.1, обнаружили отслоение водной фракции на 3 сутки хранения. Образцы эмульсии В-БМ 1.3; В-БМ 1.4; В-БМ 2.2 через 14 суток хранения при 37°С были стабильными по сравнению с контролем Montanide ISA - 70. Наиболее стабильным образцом эмульсии при хранении в течение 90 суток при 37°С являлся В-БМ 1.4

При хранении образцов эмульсии при 25°С получили результаты аналогичные полученным при хранении образцов при температурном режиме 37°С.

При температуре 2-8°С у образца В-БМ 2.1 отслоение водной фракции обнаружили уже на 3 сутки, а у образца В-БМ 2.2 на 28 сутки. Образцы В-БМ 1.3, В-БМ 1.4 и ISA-70 оказались наиболее стабильными, отслоение водной фракции не наблюдали на протяжении всего опыта.

3.3.2. Оценка реактогенности эмульсионных вакцин на крупном рогатом скоте

На следующем этапе работ провели опыт по исследованию реактогенности изготовленных образцов эмульсионных вакцин на КРС. Животные были разделены на 7 групп по 3 головы в каждой: первой группе вводили образец вакцины – В-БМ 1.1, второй группе – В-БМ 1.2, третьей группе – В-БМ 1.3, четвертой группе – В-

БМ 1.4, пятой группе – В-БМ 2.1, шестой группе – В-БМ 2.2, седьмую группу вакцинировали препаратом, изготовленным на основе масляного адьюванта – ISA-70 (контроль).

Вышеуказанные эмульсионные вакцины животным вводили подкожно в среднюю треть шеи в дозе 6 см³. Результаты учитывали на 10 сутки после инъекции путем измерения длины, ширины и высоты олеогранулемы. Объем отека рассчитывали по формуле:

$$V=l*b*h$$

Где l – длина, b – ширина, h – высота.

Результаты исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования реактогенности эмульсионных вакцин на крупном рогатом скоте

№ группы	Адьювант	Реактогенность (объем гранулемы), см ³
1	БМ 1.1	36,00±2,31
2	БМ 1.2	50,00±5,77
3	БМ 1.3	20,00±2,89
4	БМ 1.4	14,00±0,58
5	БМ 2.1	15,00±1,15
6	БМ 2.2	30,00±4,72
7 (контроль)	ISA-70	30,00±6,08

(n=3)

По результатам, полученным в ходе опыта, можно сделать вывод, что наименьшей реактогенностью обладает образец вакцины, изготовленный с использованием адьюванта БМ 1.4.

3.3.3. Определение антигенных свойств опытных образцов эмульсионных вакцин

Эмульсионные вакцины, приготовленные на предыдущем этапе, испытывали на иммуногенность на КРС. Животные были разделены на группы, в каждой по 3 головы, и иммунизированы вакцинами: 1 группа – В-БМ 1.1, 2 группа – В-БМ 1.2, 3 группа – В-БМ 1.3, 4 группа – В-БМ 1.4, 5 группа – В-БМ 2.1, 6 группа – В-БМ 2.2, 7 группа – ISA-70 (контроль).

Испытуемые вакцины вводили КРС подкожно в среднюю треть шеи в дозе 2 см³. Через 21 сутки после вакцинации отбирали пробы крови и определяли уровни гуморального иммунитета в реакции нейтрализации. Результаты представлены в таблице 5.

Из результатов опыта, представленных в таблице 5, следует, что увеличение титров ВНА у животных, привитых опытными образцами вакцин по сравнению с контролем, составили от 0,3 до 0,9 log₂. Образец вакцины В-БМ1.4. стимулировал прирост антител в 1,9 раза больше по сравнению с контрольным образцом.

Таблица 5 - Результаты исследования иммуногенной активности эмульсионных вакцин на крупном рогатом скоте

(n=3)

Образцы вакцин	Титр антител против вируса ящура А №2177/Амурский/2013, log ₂
	21 сутки после вакцинации
В-БМ 1.1	5,45±0,40
В-БМ 1.2	5,50±0,18
В-БМ 1.3	5,60±0,10
В-БМ 1.4	5,85±0,31
В-БМ 2.1	5,15±0,48
В-БМ 2.2	5,15±0,27
ISA - 70 (контроль)	4,95±0,37

3.4. Определение реактогенности, пирогенности и стабильности

эмульсионных вакцин, изготовленных на основе масляных адьювантов

В настоящее время для производства эмульсионных вакцин против ящура используются импортные масляные адьюванты фирмы «Seppic» Montanide ISA-70 и ISA-206.

Адьювант Montanide ISA-61 никогда не использовался при изготовлении противоящурных вакцин, поэтому необходимо было изучить его реактогенные и адьювантные свойства на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Контрольным образцом являлся образец вакцины, изготовленной на адьюванте Montanide ISA-206.

Для проведения опытов, изготовили образцы вакцин: №1 - с адьювантом Montanide ISA-206 (контрольный) и №2 - с адьювантом Montanide ISA-61 (испытуемый).

Водный антиген состоял из четырех штаммов вируса ящура: А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013, О№2047 Саудовская Аравия/2008, Азия-1 №1946/Шамир 3/89.

Прививная доза 2 см³ содержала иммуногенных компонентов (146S+75S) типа А №2155/Забайкальский/2013 – 7,9 мкг, А №2166/Краснодарский/2013 - 5,74 мкг, О №2047 Саудовская Аравия/2008 – 5,0 мкг и типа Азия-1 №1946/Шамир 3/89 – 6,8 мкг. В результате получили эмульсии для вакцины №1 тип эмульсии «вода-масло-вода» и №2 тип эмульсии «вода-масло».

3.4.1. Определение реактогенности эмульсионных вакцин на белых мышах

Исследуемый образец вакцины, изготовленный с использованием адьюванта Montanide ISA-61, вводили в подушечки задней правой лапки по 0,05 см³, контрольный образец, изготовленный с адьювантом Montanide ISA-206 - в подушечки задней левой лапки. Через 10 суток проводили оценку реактогенности.

Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6 - Оценка реактогенности вакцин на белых мышах

(n=10)

Масса конечностей белых мышей после введения, г		Коэффициент реактогенности, (Kp), %
Испытуемого образца ISA-61 (x ₀), г	Эталонного образца ISA-206 (x _k), г	
2,7	2,1	28,5

Примечание: <24 – слабо реактогенные; от 25 до 49 – умеренно реактогенные; от 50 до 99 – выражено реактогенные; >100 – сильно реактогенные

Из данных представленных в таблице 6 следует, что исследуемый образец вакцины обладал умеренной реактогенностью, т.к. коэффициент реактогенности составил 28,5%.

3.4.2. Определение пирогенности эмульсионных вакцин на кроликах

Оценку пирогенности проводили на кроликах массой 1,5-2,0 кг., из которых были сформированы 3 группы, по 3 головы в каждой: 1 группа – Montanide ISA - 61, 2 группа – Montanide ISA - 206, 3 группа – контроль без введения вакцин. Вакцины вводили подкожно в дозе 1см³. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Исследование пирогенности вакцин на кроликах

(n=3)

№ группы	Средние значения температуры тела после введения масел (°C)									ΔT, °C
	за 3 сут. до введения масла, °C	сутки								
		1	3	5	7	9	11	14	М	
1	38,9	39,3	38,9	39,0	38,8	38,7	38,6	38,6	38,5	0,4
2	39,2	39,2	38,5	38,5	38,4	38,6	38,7	38,7	39,0	0,2
3	39,2	39,2	39,0	38,9	38,8	38,7	38,6	38,8	39,1	-

Из результатов представленных в таблице 7 видно, что в течение опыта температура тела у животных в среднем по группе не превышала 0,4°C, что свидетельствует об апиогенности исследуемого образца вакцины.

3.4.3. Исследование стабильности эмульсии экспериментальных образцов вакцин

Образцы эмульсионных вакцин, изготовленных с использованием адъювантов ISA-206 (№1) и ISA-61 (№2) хранили при различных температурных режимах: 2-8, 25 и 37°C в течение 77 суток. Результаты представлены в таблице 8.

Из результатов, представленных в таблице 8 видно, что у исследуемых образцов наблюдалось отслоение водной фазы на дне пробирки уже на 14 сутки при 37°C. В контрольном образце выделение водной фракции обнаружили при 25°C на 42 сутки, а в опытном образце - на 77 сутки наблюдения. У образцов

вакцин, хранившихся при 2-8°C выделение водной фракции не обнаружено на протяжении всего опыта.

Таблица 8 - Исследование стабильности эмульсионных вакцин

Сутки наблю дения	Фракци	Центрифуги рование	Стабильность адьюванта ISA-61			Центрифуги рование	Стабильность адьюванта ISA-206		
			2-8°C	25°C	37°C		2-8°C	25°C	37°C
1	Е	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Е	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Е	-	-	-	1	-	-	-	0,5
42	Е	-	-	-	3	-	-	0,5	2
77	Е	-	-	3	4	-	-	1	3

Примечание: Е – водная фракция на дне пробирки; «-» - фракция не обнаружена

В результате проведенного исследования можно сделать вывод, что стабильность препарата, изготовленного с использованием масляного адьюванта Montanide ISA-61, не уступала стабильности контрольного образца, в состав которого входил адьювант ISA-206, в течение 77 суток хранения при температурах 2-8, 25, 37°C.

3.4.4. Изучение гуморального иммунитета у КРС, вакцинированного эмульсионными вакцинами с различными адьювантами

Образцами эмульсионных вакцин №1 тип эмульсии «вода-масло-вода» и №2 тип эмульсии «вода-масло», вакцинировали по 4 головы КРС подкожно в дозе 2 см³.

Гуморальный иммунитет исследовали в течение 70 суток после вакцинации. Уровень ВНА определяли в реакции нейтрализации с гомологичным вирусом и выражали в log₂ ТЦД₅₀/см³. Результаты исследований отражены в таблицах 9.

Анализ данных таблиц 9 показал, что на 7-е сутки после вакцинации (СПВ) титр антител у бычков составлял 4,0 - 4,44 и 3,62 - 4,25 log₂ соответственно по всем 4 штаммам.

Титры ВНА у животных, вакцинированных эмульсионным препаратом №1 с типом эмульсии «вода-масло-вода», возрастали до 63 СПВ, в тоже время у животных, привитых эмульсионной вакциной №2 с типом эмульсии «вода-масло», максимальный уровень ВНА обнаружили на 42 СПВ.

По истечению 70 суток (срок наблюдения) у животных, привитых вакциной №1, титр ВНА увеличился в 4,4 раза по сравнению с первым измерением, и составил 5,94-6,81 log₂. Вакцина №2 в течение аналогичного срока наблюдения стимулировала 9х кратное увеличение титров ВНА, которые достигли уровня 6,56-7,44 log₂. Вакцина, изготовленная на адьюванте ISA-61-тип эмульсии «вода-масло», с 21 СПВ стимулировала более интенсивное антителообразование.

Таблица 9 - Динамика нарастания гуморального иммунитета у КРС после вакцинации поливалентной эмульсионной вакциной №1 (ISA-206) и №2 (ISA-61).

(n=4)

	СПВ		Количество ВНА (log ₂) против КВЯ			
			А №2155	А №2166	Азия-1 Шамир	О Саудовская Аравия
ISA-206	7	М±m	4,44±0,28	4,00±0,31	4,12±0,30	4,25±0,25
	14		4,50±0,54	4,44±0,37	4,25±0,62	5,00±0,57
	21		5,00±0,18	4,88±0,36	4,94±0,81	5,31±0,66
	28		5,00±0,82	5,38±0,52	5,56±0,88	5,56±0,89
	35		5,38±0,84	6,06±0,71	6,25±0,94	5,88±1,09
	42		5,44±0,66	6,44±0,72	6,31±0,90	6,00±1,04
	49		5,75±0,71	6,81±0,66	6,62±0,97	6,31±1,03
	56		6,19±0,77	6,44±0,68	6,81±0,92	6,38±0,98
	63		6,69±0,97	6,19±0,68	6,88±0,82	6,56±0,92
	70		6,38±0,92	6,25±0,64	6,81±0,82	5,94±1,02
ISA-61	7	М±m	3,62±0,31	4,25±0,41	3,75±0,53	3,69±0,21
	14		4,75±0,60	5,62±0,41	4,38±0,46	4,62±0,37
	21		5,25±0,71	5,94±0,58	4,94±0,63	5,69±0,70
	28		6,75±1,11	7,12±0,94	5,94±1,01	6,12±0,94
	35		7,44±1,12	7,81±0,98	6,62±0,89	6,81±1,10
	42		7,31±1,07	8,12±1,19	6,62±0,79	6,88±1,01
	49		7,00±1,10	7,81±1,23	6,62±1,12	7,25±1,10
	56		6,81±1,15	7,56±1,21	6,62±1,15	7,38±1,21
	63		6,81±1,22	7,31±1,20	6,44±1,19	7,56±1,23
	70		6,94±1,14	7,44±1,27	6,56±1,05	7,25±1,21

Через 70 СПВ обе группы животных заразили интрадермолингвально смесью афтозных вирусов А №2155/Забайкальский/2013, А №2166/Краснодарский/2013, О №2047Саудовская Аравия и Азия-1 №1946 Шамир 3/89 в количестве 10⁴ ИД₅₀/0,2 см³ каждого штамма. Результаты контрольного заражения представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Иммуногенная активность эмульсионных вакцин с типом эмульсии в/м и в/м/в на КРС

(n=4)

Вакцины, тип эмульсии	Прививная доза, см ³	Количество животных в опыте	Результаты контрольного заражения через 70 СПВ		Тип вируса
			количество защищенных	наличие генерализации	
№1 (в/м/в)	2,0	4	3	1	О
№2 (в/м)	2,0	4	4	-	-

Анализ данных таблицы 10 показал, что в группе животных, иммунизированных вакциной №1, заболела с генерализацией процесса одна особь из четырех. Исследованиями вторичных афт в РСК был установлен тип

О№2047/Саудовская Аравия вируса ящура. Все четыре особи, вакцинированные препаратом №2, были защищены от генерализованной формы ящура.

3.4.5. Влияние способа введения вакцины на формирование гуморального иммунитета у КРС

Экспериментальный образец эмульсионной вакцины, изготовленной с масляным адъювантом Montanide ISA-61, вводили животным внутримышечно в круп и подкожно в среднюю треть шеи в объеме 2 см³. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 СПВ. Титры ВНА при различных способах введения вакцины отражены в таблице 11.

Таблица 11 - Влияние способа введения вакцины на формирования гуморального иммунитета у крупного рогатого скота

(n=14)

Способ введения вакцины		
Внутримышечно в круп		Подкожно в шею
Титр ВНА (log ₂)		
M±m	4,93±0,24	3,39±0,24

Из данных таблицы 11 видно, что способ введения вакцин КРС существенно влиял на выработку ВНА. Титр антител был в 2,3 раза выше у КРС, которому вакцину вводили внутримышечно в круп, по сравнению с животными, которых прививали вакциной подкожно.

Изучение местной реакции животных на введение вакцины подкожно и внутримышечно позволило сделать заключение, что при подкожном способе введения воспалительная реакция, проявляющаяся отеком, сохранялась в течение 7-14 СПВ. С 15-21 СПВ наблюдали уменьшение отека в месте введения препарата.

При внутримышечном способе инокуляции препарата реакция вместе введения визуально не выявлена.

3.4.6. Изучение гуморального иммунитета и реактогенности эмульсионных вакцин с различными адъювантами

Для изготовления вакцин использовали концентрированный антиген типа О №2212/Приморский/2014.

Были изготовлены вакцины: серия №1 - с адъювантом Montanide ISA-206, тип эмульсии «вода-масло-вода»; серия №2 – с адъювантом Montanide ISA-61, тип эмульсии «вода-масло»; серия №3 - с адъювантом БМ 1.4.139, тип эмульсии «вода-масло». Результаты опытов представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Иммуногенная активность эмульсионных вакцин для КРС

(n=3)

№ серии	Характеристика вакцины	Прививная доза, см ³	Титры ВНА против вируса ящура типа О		Наличие генерализации	Объем олеогранулемы, см ³
			14 суток	28 суток		
1	Эмульсионная ISA-206 (в/м/в)	2,0	3,75	5,00	-	20
			4,00	5,50	-	22
			3,50	4,75	-	25
			M±m	3,75±0,14	5,08±0,22	-
2	Эмульсионная ISA-61 (в/м)	2,0	2,75	4,75	-	25
			4,25	5,50	-	29
			3,75	5,50	-	23
			M±m	3,50±1,06	5,13±0,53	-
3	Эмульсионная БМ 1.4 (в/м)	2,0	2,50	6,00	-	30
			2,00	5,00	-	35
			3,25	5,50	-	29
			M±m	2,25±0,35	5,50±0,71	-

Представленные в таблице 12 результаты показали, что все вакцинированные животные были защищены от генерализованной формы ящура через 28 дней после вакцинации, при заражении гомологичным штаммом вируса ящура. Наибольшим стимулирующим действием обладала вакцина серии №3, изготовленная на адьюванте БМ 1.4.139. Однако, объем олеогранулемы на месте введения данной вакцины был в 1,5 раза больше, чем таковой у вакцины серии №1 и в 1,2 раза больше, чем у серии №2.

3.5. Эффективность и реактогенность сорбированной и эмульсионной вакцин

Целью наших исследований было изучить влияние прививной дозы на формирование гуморального иммунитета и определения реакции организма на введение препаратов.

В опыте использовали следующие вакцины:

1. Сорбированная бивалентная вакцина типов А, О, содержащая в прививной дозе 2 см³ по 6 мкг иммуногенных компонентов (146S+75S) каждого типа, 21 мг ГОА и 1,5 мг сапонины.

2. Эмульсионная бивалентная вакцина типов А, О, содержащая в прививном объеме 2 см³ по 6 мкг иммуногенных компонентов (146S+75S) каждого типа, 1 см³ адьюванта ISA-206, тип эмульсии (вода-масло-вода)

Из двенадцати овец 11 месячного возраста были сформированы 4 группы по 3 головы в каждой и вакцинированы по схеме:

Группа №1 - подкожно сорбированной вакциной с сапонином в дозе 1 см³.

Группа №2 - подкожно сорбированной вакциной в дозе 2 см³.

Группа №3 - внутримышечно эмульсионной вакциной в дозе 1 см³.

Группа №4 - внутримышечно эмульсионной вакциной в дозе 2 см³.

Уровень гуморального иммунитета после вакцинации исследовали через 15 и 30 суток.

Через 30 суток после вакцинации провели патологоанатомический осмотр животных. В местах инъекции сорбированной вакцины с сапонином в дозе 1 см³ уплотнений не обнаружили, в месте введения 2см³ наблюдали небольшие уплотнения.

Места инъекции эмульсионной вакцины были болезненными, особенно при введении 2 см³. При патологоанатомическом вскрытии в месте инъекции обнаружили олеогранулемы размером 1,5х2,5 см.

Таблица 13 – Средние титры ВНА у овец после вакцинации эмульсионной и сорбированной вакцинами

(n=3)

№ группы		Титры антител против вируса ящура тип, log ₂			
		15 суток		30 суток	
		А	О	А	О
1	М±m	3,5±0,29	3,5±0,14	4,08±0,08	4,33±0,17
2		4,17±0,17	4,08±0,22	4,75±0,14	4,58±0,30
3		5,42±0,08	5,7±0,08	6,75±0,14	6,75±0,14
4		6,3±0,17	6,25±0,25	7,17±0,17	7,25±0,14

Как видно из данных таблицы 13, с увеличением прививной дозы в 2 раза титры ВНА в крови иммунизированных животных были выше для сорбированной вакцины на 0,58-0,67 log₂ на 15 СПВ и на 0,25-0,67 log₂ на 30 СПВ. Для эмульсионной вакцины титры ВНА на введение двойной дозы препарата были выше на 0,58-1,11 log₂ на 15 сутки и 0,42-0,50 log₂ на 30 сутки после вакцинации.

Уровень гуморального иммунитета на введение эмульсионной вакцины был выше, чем после инъекции сорбированного препарата, как через 15 суток, так и через 30 суток после вакцинации.

При вспышке ящура можно рекомендовать в очаге и неблагополучном пункте использовать для вакцинации двукратную дозу вакцины, для формирования быстрого и напряженного иммунитета, а не ревакцинацию через 10-20 дней, как указано в инструкции по применению.

3.6. Сохраняемость антигена в эмульсионных вакцинах

Иммуногенность вакцин, в первую очередь, зависит от количества вирусспецифического антигена в прививной дозе и во вторую очередь - от стимулирующих свойств адьюванта.

Три серии эмульсионных вакцин, хранили при температуре 2-8°С в течение 18 месяцев. На 6, 12, 18 месяц хранения эмульсии разрушали и исследовали

сохранность вирусспецифического антигена, измеряя его количество. Результаты исследований представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Количество вирусспецифического антигена типа О №2212/Приморский/2014 в вакцинах при хранении.

№ серии	Характеристика вакцины	Концентрация (мкг/см ³) компонентов антигена в вакцине по результатам РСК			
		До начала хранения	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев
1	ISA-206 (в/м/в)	9,4 мкг/см ³	8,2 мкг/см ³	7,8 мкг/см ³	7,3 мкг/см ³
2	ISA-61 (в/м)	9,4 мкг/см ³	8,6 мкг/см ³	8,3 мкг/см ³	7,9 мкг/см ³
3	БМ 1.4.139 (в/м)	9,4 мкг/см ³	9,2 мкг/см ³	8,5 мкг/см ³	7,1 мкг/см ³

Результаты исследований, представленные в таблице 14, показали, что концентрация иммуногенных компонентов в процессе хранения уменьшилась для вакцины с адьювантом ISA-206 на 22,3%, с адьювантом ISA-61 на 10% и с адьювантом БМ 1.4.139 на 24,5% за 18 месяцев хранения при температуре 2-8°C.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. Изучены компоненты для изготовления масляного адьюванта БМ 1.4.139 из отечественного сырья.

2. Эмульсионная вакцина, изготовленная на основе адьюванта БМ 1.4.139, сохраняла стабильность при температуре 37, 25, 2-8°C в течение 90 суток хранения (срок наблюдения).

3. Иммуногенность эмульсионной вакцины, изготовленной на основе адьюванта БМ 1.4.139, была в 1,9 раза выше, чем иммуногенность вакцины на основе адьюванта Montanide ISA-70.

4. Эмульсионные вакцины, изготовленные на отечественном адьюванте БМ 1.4.139, формировали иммунитет у КРС, достаточный для защиты от контрольного заражения гомологичным штаммом вируса.

5. Эмульсионная вакцина, изготовленная с использованием адьюванта Montanide ISA-61, стабильна при хранении, формирует напряженный и продолжительный иммунитет у КРС.

6. Установили, что увеличение количества ВНА у животных, вакцинированных препаратом, изготовленным с адьювантом Montanide ISA-61 к 70 суткам после вакцинации, было в 9 раз выше, по сравнению с первым измерением на 7 сутки, в то время как увеличение уровня ВНА у животных, привитых вакциной с адьювантом Montanide ISA-206 в этих же условиях, составило 4,4 раза.

7. Внутримышечный способ введения эмульсионной вакцины КРС стимулировал в 2,3 раза больший уровень ВНА по сравнению с подкожным введением препарата.

8. Установлено, что реактогенность эмульсионной вакцины, изготовленной на основе адъюванта Montanide ISA-61, на 18,8% меньше, чем у контрольной вакцины, изготовленной на основе адъюванта Montanide ISA-206.

9. Вакцинация овец двукратной дозой сорбированной и эмульсионной вакцинами не вызывает чрезмерной реакции в точке введения и формирует более высокий уровень антител у животных по сравнению с однократной дозой.

10. Сохранность антигена в эмульсионных вакцинах с различными адъювантами составила от 75,5 до 84% через 18 месяцев хранения при температуре 2-8°C.

4.2 Практические предложения

Результаты научных исследований по совершенствованию технологии изготовления вакцины против ящура использованы для подготовки научно – технической документации: СТО 00495527-0143-2018 «Вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21)».

4.3 Перспективы дальнейшей разработки темы

Предметом дальнейших исследований является проведение клинических и полевых испытаний эмульсионных вакцин с новым отечественным адъювантом БМ 1.4.139.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Comparative study for immune efficacy of two different adjuvants bivalent FMD vaccines in sheep / A.M.A. Selim, N.Z. Abouzeid, A.M. Aggour, N.M. Sobhy // J. Amer. Sci. – 2010. –Vol. 6, N 10. – P. 1292-1298.

2. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols / ed. D. T. O’Hagan. – Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2000. — 342 p. – (Methods in Molecular Medicine / ed. J. M. Walker. Vol. 42.)

3. Мамков, Н. С. Оценка реактогенности компонентов эмульсионных вакцин на белых мышах / Н. С. Мамков, В. Ю. Савельев, А. И. Дудников // Актуальные пробл. вет. вирусологии. : тез. докл. науч. конф. посвящ. 30-летию ВНИИЯИ. – Владимир, 1988. – Ч. 2. – С. 31-33.

4. Михалишин, В.В. Адъюванты и их использование / В.В. Михалишин, Н.С. Мамков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. Владимир, 2008. – Т. 6: Материалы Междунар. науч. конф. "Инфекц. патология животных", посвящ. 50-летию ФГУ "ВНИИЗЖ". – С. 340-371.

5. МЭБ. Кодекс здоровья наземных животных. – Т. 1-2. - 21-е изд. – Paris, 2012. – 836 с.

6. Яременко, Н.А. Изучение напряженности гуморального иммунитета у свиней, привитых эмульгированной вакциной против ящура А22 / Н.А. Яременко // Актуальные проблемы вет. вирусологии: тез. докл. науч. конф. – Владимир, 1980. – С. 70-71.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изучение гуморального иммунитета у животных, иммунизированных эмульсионными противоящурными вакцинами / С.Р. Кременчугская, Н.Н. Луговская, Т.К. Майорова, **А.С. Шарыпов** // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 1. - С. 55-57.

2. Контроль иммуногенности противоящурных вакцин ФГБУ "ВНИИЗЖ" на отсутствие индукции антител к неструктурным белкам вируса / Д. А. Лозовой, Д. В. Михалишин, В. А. Стариков, М.А. Доронин, **А.С. Шарыпов**. // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 3. - С. 6-12.

3. Влияние прививочной дозы сорбированной и эмульсионной противоящурных вакцин на формирование гуморального иммунитета у овец / **А. С. Шарыпов**, Д. А. Лозовой // Ветеринария и кормление. - 2017. - № 3: Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии: материалы конференции. - С. 100-101.

4. Испытания эмульсионных вакцин на основе белых масел, полученных гидрокаталитической переработкой нефтяного сырья / И.В. Пиголева, **А.С. Шарыпов**, Т.Н. Шабалина [и др.] // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 4. - С. 42-48.

5. Патент № 2652889 Российская Федерация, МПК А61К 39/135 (2006.01). Способ изготовления вакцины инактивированной эмульсионной против ящура и вакцина инактивированная эмульсионная против ящура [Текст] / Пат. 2652889, Д.А. Лозовой, В.А. Стариков, Д.В. Михалишин А.В. Борисов, **А.С. Шарыпов**. ; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - № 2017119734 ; Заявл. 06.06.2017 ; Опубл. 03.06.2018, Бюл. № 13.

Подписано в печать ____ июля 2019 г.
Формат 60×90 1/16. Усл. печ. л.1.
Тираж 80 экз.
Отпечатано на полиграфической базе ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»