



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011150301/15, 06.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.12.2011

(45) Опубликовано: 27.05.2013 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Инструкция по изготовлению и контролю иммуноглобулина люминесцирующего диагностического к риккетсиям группы клещевой пятнистой лихорадки мышинного сухого / Гольдин Р.Б. [и др.] // Утверждена начальником Научно-исследовательского института военной медицины 24.12.1982. - Л.: [В.и.], 1982. с.40. RU 2413533 C2, 10.03.2011. RU 2368393 C2, 27.09.2009. SU 1733004 A1, 15.05.1992.**

Адрес для переписки:

195043, Санкт-Петербург, К-43, ул.  
Лесопарковая, 4, **ВОЙСКОВАЯ  
ЧАСТЬ 41598**

(72) Автор(ы):

**Попов Станислав Владимирович (RU),  
Нуралова Ирина Васильевна (RU),  
Стапанов Александр Валентинович (RU),  
Зуева Наталья Валерьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**ВОЙСКОВАЯ ЧАСТЬ 41598 (RU)**

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННЫХ РИККЕТСИОЗНЫХ СЫВОРОТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно микробиологии, клинической и лабораторной диагностике и иммунологии. Способ получения гипериммунных риккетсиозных сывороток заключается в следующем. Иммунизацию кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста массой 2,5-3,0 кг проводят в два этапа. При первичной иммунизации вводят смесь 10% суспензии инфекционного риккетсиозного материала (0,5 мл) и полного адьюванта Фрейнда, взятого в объеме, в 1,5 раза превышающем объем инфекционного материала (0,75 мл). Для стимуляции первичного иммунного ответа смесь вводят однократно внутривенно микродозами паравертбрально в 40 точек. В качестве

инфекционного риккетсиозного материала используют гомогенизированные оболочки желточных мешков куриных эмбрионов, инфицированных *R.prowazekii*, или гомогенизированные селезенки беспородных белых мышей массой 16-18 г, инфицированных риккетсиями вида *S.burnetii* или *R.sibirica*. Через 45 сут при условии снижения титров антител, продуцированных в результате первичной иммунизации, до 1:20-1:80, начинают реиммунизацию: четырехкратно осуществляют внутривенные инъекции инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов для реакции связывания комплемента в концентрации не менее 4-х антигенных единиц в 1 мл и в возрастающих дозах, составляющих 1,0, 1,5, 2,0 и 2,5 мл, с

интервалом после каждого введения антигена 3 сут. Для коррекции цитокинового дисбаланса и дополнительной стимуляции образования антител на этапе реиммунизации дополнительно подкожно вводят рекомбинантный ИЛ-2 человека (ронколейкин) в объеме 1,0 мл и в дозе 250000 МЕ. Тотальный забор крови для приготовления сывороток осуществляют на 14 сут после последней внутривенной инъекции и при титрах специфических антител в НМФА не ниже 1:5120-1:10240. Продолжительность полного цикла иммунизации в соответствии с

заявляемым способом составляет 68 сут. Изобретение обеспечивает сокращение в 2,3 раз времени иммунизации (со 158 сут до 68 сут) и получение гипериммунных сывороток, в 4-8 раз превосходящих по накопленным титрам риккетсиозных антител, снижение в 4,7 раз материальных затрат на содержание животных-продуцентов и приобретение адъювантов, уменьшение в 5,2 раз уровня трудозатрат за один производственный цикл получения гипериммунных риккетсиозных сывороток, экономии в 4,2 раза фонда заработной платы. 3 табл., 4 пр.

RU 2 4 8 2 8 7 5 C 1

RU 2 4 8 2 8 7 5 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011150301/15, 06.12.2011**(24) Effective date for property rights:  
**06.12.2011**

Priority:

(22) Date of filing: **06.12.2011**(45) Date of publication: **27.05.2013 Bull. 15**

Mail address:

**195043, Sankt-Peterburg, K-43, ul. Lesoparkovaja,  
4, VOJSKOVAJa ChAST' 41598**

(72) Inventor(s):

**Popov Stanislav Vladimirovich (RU),  
Nuralova Irina Vasil'evna (RU),  
Stapanov Aleksandr Valentinovich (RU),  
Zueva Natal'ja Valer'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**VOJSKOVAJa ChAST' 41598 (RU)**(54) **METHOD FOR PREPARING HYPERIMMUNE RICKETTSIAL SERUMS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely microbiology, clinical and laboratory diagnosis and immunology. A method for preparing hyperimmune rickettsial serums is as follows. Male 10-12-month Chinchilla rabbits 2.5-3.0 kg are immunised at two stages. At the primary immunisation, a mixture of 10% suspension of the rickettsial infectious material (0.5 ml) and Freund's complete adjuvant taken in volume 1.5 times exceeding the amount of the infectious material (0.75 ml) is administered. To stimulate the primary immune response, the mixture injected once in intradermal paravertebral microdoses in 40 points. The infection rickettsial material is homogenised membranes of yolk sacs of chicken embryos infected with *R. prowazekii*, or homogenised spleen of inbred albino mice 16-18 g infected with rickettsial *C.burnetii* or *R. sibirica*. Thereafter 45 day later, provided reducing the antibody titres produced as a result of the primary immunisation, up to 1:20-1:80, the re-immunisation is started: four-fold intravenous injections of the inactivated antigens of the relevant rickettsial pathogens to complement fixation

in the concentration of at least 4 antigen units in 1 ml with increasing doses of 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 ml, every 3 days after each injection. For the purpose of the cytokine imbalance correction and additional stimulation of antibody formation at the stage of re-immunisation, recombinant human IL-2 (roncoleukin) in a volume of 1.0 ml at a dose of 250 000 ME is additionally subcutaneously administered. Total blood sampling for preparing serums is performed on the 14<sup>th</sup> day following the last intravenous injection and specific antibody titres of in indirect immunofluorescent technique not less than 1:5120-1:10240. The length of a complete cycle of immunisation in accordance with the delared method is 68 days.

EFFECT: invention provides reducing the length of immunisation in 2,3 times (from 158 days to 68 days) and preparing the hyperimmune sera, having the collected rickettsial antibody titres in 4-8 times, increasing the material costs for keeping producer animals in 4,7 times and reducing the labour costs in 5,2 times over a production cycle of preparing the rickettsial hyperimmune sera, saving the wages fund in 4,2 times.

3 tbl, 4 ex

Изобретение относится к областям медицины, а именно микробиологии, клинической и лабораторной диагностике и иммунологии, касается способа получения гипериммунных сывороток, предназначенных для приготовления иммунобиологических диагностических препаратов (ИДП), с использованием кроликов в качестве животных-продуцентов, и может найти применение при выявлении риккетсий в клинических, эпидемиологических, энзоотических и экспериментальных материалах.

Как известно, патогенные риккетсий вызывают у человека развитие различной тяжести лихорадочных заболеваний (риккетсиозы) [1-5]. Наиболее эпидемиологически значимыми среди них являются заболевания группы лихорадки Ку (возбудитель - *S.burnetii*), клещевые пятнистые лихорадки - клещевой сыпной тиф Северной Азии (возбудитель - *R.sibirica*) и эпидемический сыпной тиф (возбудитель - *R.prowazekii*). Эпидемиология и эпизоотология этих риккетсиозов характеризуются распространением среди людей и животных с помощью членистоногих-переносчиков (вши, блохи), которые выделяют риккетсий с фекалиями или коксальной жидкостью (клещи). Заражение людей, как правило, происходит трансмиссивным, алиментарным, а также, что особо важно, воздушно-пылевым путем или контаминацией выделений переносчиков. Помимо этого распространение риккетсиозов может происходить посредством различных выделений больных животных [1, 6-14].

По распространенности на территории России постоянных природных очагов с циклической активацией и постоянным расширением границ ареалов, а также тяжести протекания болезни с ее возможной хронизацией клещевой сыпной тиф Северной Азии (*R.sibirica*) и лихорадка Ку (*S.burnetii*) на сегодняшний день актуальны и имеют высокое эпидемиологическое значение [9, 15-23].

Также, несмотря на почти повсеместную ликвидацию в развитых странах эпидемического сыпного тифа, *R.prowazekii* продолжают являться угрозой применения их в качестве биологического оружия или завоза данного заболевания с эндемичных территорий. По данным официальной статистики, эпидемический сыпной тиф (*R.prowazekii*) в России регистрируется только в виде его носительства - болезни Брилля-Цинсснера, однако в других странах с неблагоприятными санитарно-эпидемиологическими условиями он часто вызывает эпидемии. В то же время возрастающий уровень заболеваемости педикулезом на территории России и одновременно отсутствие иммунизированных групп населения могут явиться причиной и благоприятным условием для развития эпидемии сыпного тифа. Велика также вероятность завоза риккетсиозов из стран (трудовая миграция, беженцы), эндемичных по данным заболеваниям [18, 24-28].

Вместе с тем, следует отметить, что при регистрации стабильной заболеваемости риккетсиозами наблюдается гиподиагностика данных инфекций ввиду отсутствия ИДП, выпускаемых в промышленных условиях, предназначенных для выявления риккетсий вышеперечисленных групп.

На сегодняшний день для диагностики риккетсиозов предложено использовать следующие группы лабораторных методов:

- серологические (реакция нейтрализации, реакция агглютинации (РА) реакции торможения гемагглютинации, реакция связывания комплемента (РСК), реакция диффузионной преципитации в агаре и др.);

- иммунохимические (иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ, метод флюоресцирующих антител (МФА), иммунная хроматография и др.);

- молекулярно-биологические (полимеразная цепная реакция (ПЦР), реакция

молекулярной гибридизации, анализ полиморфизма длин регистрационных фрагментов, секвенирование геномных нуклеиновых кислот и др.).

При этом наиболее быстрыми, специфичными и чувствительными, по мнению большинства исследователей, являются МФА и ПЦР [10, 18, 21, 29-32]. Для ПЦР в настоящее время созданы наборы праймеров для идентификации почти всех представителей риккетсиозов. Указанный метод является высокоспецифичным и чувствительным, однако в силу необходимости использования специального оборудования и стационарных условий проведения реакций, а также из-за значительной стоимости исследованных проб его проводят в основном при осуществлении научных исследований. Кроме того, в случаях присутствия в пробах «уклоняющихся» (генетически модифицированных) штаммов риккетсий метод ПЦР становится нечувствителен. В связи с этим данный метод пока недоступен как для проведения массовых клинико-диагностических исследований, так и для осуществления индикации и идентификации риккетсий в полевых условиях [26].

МФА, напротив, не требует оснащения дорогостоящим приборным оборудованием, высокоспецифичен, чувствителен и экономичен, не требует больших затрат времени, позволяет проводить массовые обследования при минимальных трудозатратах и в любых условиях, поэтому вполне доступен большинству медицинских учреждений. Однако следует отметить проблемы, возникающие при приготовлении риккетсиозных ИДП для МФА, связанные прежде всего с их невысокой иммуногенностью при иммунизации животных-продуцентов и получением иммунных сывороток с низкими титрами, а также с большими материальными затратами на содержание животных в течение достаточно длительного цикла иммунизации (до 6 мес и более). Повышение при этом эффективности иммунизации, то есть получение гипериммунных сывороток (иммунных сывороток с высоким содержанием специфических антител) - основного субстрата для приготовления ИДП - за минимальные сроки, является наиболее сложной задачей, реализацию которой осуществляют либо путем совершенствования схем иммунизации, либо использованием при иммунизации препаратов, способных усиливать иммунный ответ на введение антигенов [33-42].

Учитывая, что все звенья иммунореактивности находятся под контролем цитокинов, экспрессия генов иммуноглобулинов в клетках-мишенях (В-лимфоцитах), отвечающих за гуморальный ответ, происходит под влиянием цитокинов - ИЛ 1, 2, 3, 4, 5 и 6, а действие традиционных адъювантов на дальнейший ход иммунных процессов также опосредуется определенными цитокинами [36, 41, 43-45]. В начале 1990 гг. было высказано предположение о возможности использования цитокинов в качестве адъювантов вакцин [46]. Результаты последующих исследований подтвердили правильность этого предположения. При этом среди цитокинов перспективными в плане адъювантной активности рассматриваются ИЛ-2 и препараты на его основе, что, по-видимому, неслучайно, поскольку данный цитокин - один из ключевых компонентов цитокиновой сети, занимающий важное место в иммуногенезе вследствие своих биологических и иммуностропных эффектов: индукция пролиферации В-лимфоцитов, активация цитотоксических Т-лимфоцитов, стимуляция естественных киллеров, стимуляция синтеза и секреции ИЛ-4, ИЛ-6, интерферона- $\gamma$ , колониестимулирующего фактора и фактора некроза опухоли [47, 48]. Мишенью действия ИЛ-2 являются клетки, имеющие на поверхности мембраны специфический высокоаффинный рецептор, взаимодействуя с которым цитокин способствует активации и пролиферации иммунокомпетентных клеток и развитию иммунного

ответа на антигенное воздействие вне зависимости от его природы. Именно благодаря таким иммуностропным эффектам ИЛ-2 проявил себя иммунологическим адъювантом в отношении вакцин против ящура, бронхопневмоний и вирусных диарей крупного рогатого скота, а также гемофильной плевропневмонии свиней [49, 50]. В

5 экспериментальных условиях ИЛ-2 достаточно эффективно повышал иммуногенные свойства ДНК-вакцин против ВИЧ-инфекции [51-53], осповакцины [54] и герпеса [55]. В клинической практике адъювантный эффект низких доз ИЛ-2 продемонстрирован при сочетанном его введении с гриппозной вакциной. При этом пациенты, получавшие вакцину вместе с ИЛ-2, были более устойчивы к гриппозной инфекции [56]

Не менее выраженными адъювантными свойствами обладали рекомбинантные аналоги ИЛ-2. Так, в экспериментальных условиях под влиянием пролейкина повышалась иммуногенность ДНК-вакцины вирусного гепатита В, поксвирусной рекомбинантной вакцины, экстракта вируса простого герпеса (HSV-2) или рекомбинантного гликопротеина D, выделенного из HSV-2. В аналогичных условиях адъювантные свойства были установлены и у другого рекомбинантного аналога ИЛ-2 - отечественного препарата ронколейкина, применение которого способствовало повышению в среднем на 30% иммуногенности вакцины герпетической культуральной инактивированной сухой, вакцины венесуэльского энцефаломиелиита лошадей инактивированной сорбированной жидкой, полианатоксина против ботулизма и раневых клостридиозов по сравнению с их применением без иммунологического адъюванта [48, 57, 58].

25 В то же время данные об использовании препаратов на основе ИЛ-2 с целью повышения иммуногенных свойств риккетсиозных антигенов, в том числе для получения гиперимунных сывороток, в настоящее время в доступных источниках информации отсутствуют.

30 В качестве прототипа принят способ [59-62], широко применяемый в технологии получения риккетсиозных ИДП и наиболее близкий к предлагаемому изобретению по технической сущности и качеству получаемых риккетсиозных иммунных сывороток. В соответствии со способом-прототипом проводится иммунизация кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста и массой 2,5-3,0 кг поэтапно (в два 35 этапа - первичная иммунизация и реиммунизация) и при первичной иммунизации предусматривается введение внутримышечно дважды, с интервалом в 7 сут, смеси 10% суспензии инфекционного риккетсиозного материала, представляющего собой гомогенизированные оболочки желточных мешков куриных эмбрионов, инфицированных *R. prowazekii*, с равным по объему количеством полного адъюванта Фрейнда (по 0,5 мл каждого при первой инъекции и по 0,75 мл каждого при повторной 40 инъекции). Для риккетсий вида *S. burnetii* или *R. sibirica* используется 10% суспензия инфекционного риккетсиозного материала, полученного из селезенки беспородных белых мышей массой 16-18 г, инфицированных этими возбудителями.

45 Через 120 сут при условии снижения титров антител, продуцированных в результате первичной иммунизации, до 1:20-1:80 осуществляется второй этап иммунизации (реиммунизация), предусматривающий четыре внутрибрюшинные инъекции и введение инфекционного материала (10% суспензии риккетсий) без адъюванта в возрастающих 50 дозах, составляющих 1,0, 1,5, 2,0 и 2,5 мл, и с интервалом после каждого введения 3 сут.

Тотальный забор крови для приготовления сывороток осуществляется на 21 сут после последней внутрибрюшинной инъекции и при титрах специфических антител в непрямом методе флюоресцирующих антител (НМФА) не ниже 1:1280-1:2560.

Продолжительность полного цикла иммунизации при этом составляет 158 сут.

Широкому использованию способа-прототипа препятствуют низкий титр специфических антител в получаемой иммунной сыворотке по окончании проведения иммунизации, высокая разовая нагрузка на организм животных антигенным материалом, что может привести к их гибели, а также продолжительное нахождение животных в эксперименте и связанный с этим высокий уровень материальных затрат на расходы по уходу за ними и кормлению. Следует также отметить высокую трудоемкость способа-прототипа в связи с необходимостью проведения на этапе реиммунизации четырех внутрибрюшинных инъекций инфекционного материала, связанных с повышенной травматизацией животного-продуцента.

Указанные существенные недостатки свидетельствуют о невозможности широкого использования способа-прототипа при производстве риккетсиозных ИДП на основе получаемых иммунных сывороток в промышленных условиях.

Цель изобретения заключается в изыскании способа получения гипериммунных кроличьих сывороток, пригодных для приготовления иммунобиологических диагностических препаратов, предназначенных для выявления актуальных в эпидемиологическом отношении риккетсиозов, отличающегося простотой проведения и низким уровнем материальных затрат на содержание животных и оплату труда персонала, минимальными сроками иммунизации, а полученные сыворотки - высокой специфической активностью.

Указанная цель достигается путем создания и применения способа, обеспечивающего получение в существенно более короткие сроки риккетсиозных гипериммунных сывороток с высокой специфической активностью, пригодных для приготовления ИДП, предназначенных для выявления актуальных в эпидемиологическом отношении риккетсиозов.

Основу заявляемого способа составляет двухэтапная схема иммунизации кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста массой 2,5-3,0 кг как наиболее эффективная для приготовления риккетсиозных иммунных сывороток, при которой после первой инъекции антигена с последующим перерывом делают повторные инъекции антигенов. Для проведения первичной иммунизации использовался опыт получения антител к низкомолекулярным гормонам - паравертебральная внутрикожная многоточечная иммунизация кроликов микродозами смеси антигена с полным адьювантом Фрейнда [40]. Паравертебральный внутрикожный способ аппликации антигенного материала был выбран не случайно, поскольку он отличается от других путей введения антигена вследствие наличия в коже большого числа различных специфических и неспецифических антигенпрезентирующих иммунных клеток [39, 63]. Помимо этого кожные покровы содержат большое количество различных субпопуляций Т-лимфоцитов, осуществляющих функции местного адаптивного иммунитета кожи [64, 65], дендритных клеток, естественных киллеров, синтезирующих и секретирующих гуморальные факторы врожденного иммунитета. За счет этого в коже могут самостоятельно происходить все необходимые этапы полноценного иммунного ответа на антигенное воздействие: первичное распознавание антигена, фагоцитоз, презентация антигена, клональная экспансия специфических Т-лимфоцитов и генерация эффекторных иммунных реакций [66]. Кроме того, освобождение небольших количеств (микродоз) антигена из многих участков происходит значительно быстрее, чем освобождение его большого объема из одного участка.

Сущность заявляемого способа заключается также в том, что в отличие от способа-

прототипа в схеме реиммунизации (на втором этапе) используют основной противовоспалительный цитокин - интерлейкин-2, запускающий весь «цитокиновый каскадный механизм», что способствует коррекции цитокинового дисбаланса и стимуляции более эффективного антителообразования у животных-продуцентов.

Кроме того, указанный цитокин вводят в виде рекомбинантного ИЛ-2 - ронколейкина, являющегося структурным и функциональным аналогом эндогенных белков [67]. Данное обстоятельство позволяет, с одной стороны, снизить вероятность возникновения аллергических реакций при иммунизации и, с другой стороны, направленно влиять на клеточное и гуморальное звено иммунного ответа.

Возможность достижения цели изобретения подтверждается результатами проведенных исследований, представленными в следующих примерах.

Пример 1. Реализация заявляемого способа получения риккетсиозных гипериммунных сывороток.

Для иммунизации использовали кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста массой 2,5-3,0 кг. Суть заявляемого способа заключается в том, что иммунизацию кроликов проводят поэтапно (в два этапа) и для его осуществления используют 10% суспензию инфекционного риккетсиозного материала (на первом этапе иммунизации) и инактивированные антигены соответствующих возбудителей риккетсиозов (на этапе реиммунизации).

На первом этапе иммунизации (первичная иммунизация) инфекционный риккетсиозный материал вводят однократно и совместно с адьювантом Фрейнда (вводится в объеме, в 1,5 раза превышающем объем инфекционного материала), внутривенно в 40 точек паравертебрально (вдоль позвоночника животного-продуцента). Паравертебральный внутривенный способ аппликации антигенного материала с повышенным содержанием адьюванта осуществляется с целью стимуляции максимального первичного иммунного ответа на введение антигена на первом этапе иммунизации.

При первичной иммунизации в соответствии с заявляемым способом внутривенно вводят смесь 10% суспензии инфекционного материала, взятого в объеме 0,5 мл, и полного адьюванта Фрейнда, взятого в объеме 0,75 мл.

В качестве инфекционного риккетсиозного материала используют гомогенизированные оболочки желточных мешков куриных эмбрионов, инфицированных *R.prowazekii*, или гомогенизированные селезенки беспородных белых мышей массой 16-18 г, инфицированных *S.burnetii* или *R.sibirica*.

Смесь 10% суспензии инфекционного риккетсиозного материала и полного адьюванта Фрейнда вводят микродозами в 40 точек вдоль позвоночника животного-продуцента.

Через 45 сут при условии снижения титров антител, продуцированных в результате первичной иммунизации, до 1:20-1:80, начинают второй этап иммунизации (реиммунизацию), предусматривающий четыре внутривенные инъекции инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов в концентрации не менее 4-х антигенных единиц в 1 мл и в возрастающих дозах, составляющих 1,0, 1,5, 2,0 и 2,5 мл, с интервалом после каждого введения антигена 3 сут. При этом используют коммерческие диагностикумы, содержащие инактивированные антигены возбудителей риккетсиозов для проведения серодиагностики по реакции связывания комплемента (РСК): диагностикум риккетсиозный Провачека для РСК сухой (ФСП 42-0504-7378-06), диагностикум риккетсиозный Сибирика для РСК сухой (ФСП 42-0504-7377-06), диагностикум



коксиеллезный Бернета для РСК сухой (ФС 42-2 ВС-91) (НПО «Микроген», Москва).

В отличие от способа-прототипа на этапе реиммунизации при осуществлении заявляемого способа наряду с внутривенными инъекциями инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов дополнительно подкожно вводят рекомбинантный ИЛ-2 человека (ронколейкин) в объеме 1,0 мл и в дозе 250000 МЕ для коррекции цитокинового дисбаланса и дополнительной стимуляции антителообразования.

Забор крови для приготовления сывороток осуществляют на 14 сут после последней внутривенной инъекции инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов и при титрах специфических антител в НМФА не ниже 1:5120-1:10240.

Продолжительность полного цикла иммунизации в соответствии с заявляемым способом составляет 68 сут.

Пример 2. Сравнительная оценка уровней специфической активности кроличьих сывороток, полученных заявляемым способом и способом-прототипом.

Для сравнительной оценки в НМФА уровней специфической активности кроличьих сывороток, полученных заявляемым способом и способом-прототипом, использовали кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста массой 2,5-3,0 кг.

Критериями специфической активности приготовленных кроличьих сывороток служили титры антител в реакции НМФА при разведении сывороток от 1:160 до 1:10240.

Забор крови для оценки специфической активности осуществляли из краевой вены уха кроликов на 10 сут после последнего введения инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов, а на 14 сут осуществляли тотальный забор крови. Ретракцию сгустков крови осуществляли в термостате при температуре 37°C в течение 30-40 мин, после чего сосуды с забранной кровью отстаивали в течение 1 сут при температуре 4°C. Отделившуюся от сгустка крови сыворотку в дальнейшем использовали для последующих этапов производства риккетсиозных ИДП.

Результаты сравнительной оценки уровней специфической активности риккетсиозных сывороток, полученных заявляемым способом и способом-прототипом, и статистической обработки данных, полученных при титровании соответствующих кроличьих сывороток в НМФА с использованием критерия Манна-Уитни, представлены в таблице 1.

Как видно, заявляемый способ по сравнению со способом-прототипом имеет ряд преимуществ. Так, получаемые при его использовании иммунные кроличьи сыворотки обеспечивают более высокие (в 4-8 раз) титры антител, причем ко всем изучаемым эпидемиологически значимым возбудителям риккетсиозов (*R. prowazekii*, *R. sibirica*, *S. burnetii*). Кроме того, заявляемый способ позволяет получить риккетсиозные сыворотки в более короткие сроки (68 сут вместо 158 сут).

Пример 3. Сравнительная оценка количественных показателей  $\gamma$ -глобулинов, полученных заявляемым способом и способом-прототипом.

Критериями оценки служили объем, содержание белка и процентный выход  $\gamma$ -глобулиновых фракций при их экстракции из полученных сывороток. Оценку проводили с применением стандартного метода по Нечаевой А.С. [68].

Среднегеометрические количественные показатели фракций  $\gamma$ -глобулинов, выделенных из полученных с применением способа-прототипа или заявляемого способа сывороток, представлены в таблице 2. Установлено, что в случае

использования заявляемого способа объем получаемой  $\gamma$ -глобулиновой фракции в 2 раза больше и содержание в ней белка увеличено в 2,9 раз. При этом выход  $\gamma$ -глобулиновой фракции по белку также увеличился в 2,1 раз.

5 Для приготовления 1000 мл 1% по белку флюоресцирующих иммуноглобулинов с применением способа-прототипа необходимо получить от животных-продуцентов около 700-800 мл исходной авидной иммунной сыворотки, содержащей примерно 6-7% белка. При этом необходимо иммунизировать 20 кроликов. В то же время для получения 1000 мл 1% по белку флюоресцирующих иммуноглобулинов в соответствии с заявляемым способом достаточно 300-400 мл гипериммунной сыворотки, содержащей 17-18% белка, что можно обеспечить при иммунизации 5 кроликов.

Пример 4. Результаты расчета затрат на проведение способа-прототипа и заявляемого способа получения риккетсиозных кроличьих сывороток.

15 Критериями при расчете затрат, связанных с проведением применяемых способов получения риккетсиозных сывороток, служили: стоимость животных-продуцентов и нормативы их кормления, а также стоимость адьювантов, используемых при иммунизации, трудозатраты и заработная плата сотрудников за один производственный цикл получения сывороток.

20 Результаты расчета затрат на проведение заявляемого способа и способа-прототипа приведены в таблице 3, из которой следует, что материальные затраты на содержание животных-продуцентов и приобретение адьювантов, использованных при иммунизации с применением заявляемого способа, уменьшились с 89566,00 руб. до 18689,00 руб., то есть снизились в 4,7 раз по сравнению со способом-прототипом.

25 При расчете стоимости полного рациона корма на одного кролика в течение суток исходили из норм довольствия на кг веса животного и средних рыночных цен на корма. Так, например, для одного кролика массой 2,5-3,5 кг в течение суток необходимо 200 г комбикорма, 120 г моркови, 60 г свеклы, 90 г сена, по 450 г зеленой массы овса и травы, по 4 г дрожжей и рыбьего жира и 1 г соли. Расчеты суточной потребности в кормах для кроликов и затрат на их приобретение по среднерыночным ценам приведены в таблице 4.

30 В таблице 5 приведены расчеты трудозатрат и заработной платы сотрудников за один производственный цикл получения риккетсиозных сывороток при средней заработной плате лаборанта, составляющей 17000 руб., и научного сотрудника - 28000 руб. Как видно, заявляемый способ получения гипериммунных сывороток позволяет снизить трудозатраты в 5,2 раз по сравнению со способом-прототипом.

35 Для иммунизации 20 кроликов с применением способа-прототипа необходимо как минимум два лаборанта и два научных сотрудника. Из 158 сут нахождения животных-продуцентов в иммунизации 116 сут являлись полными рабочими днями. При расчете трудозатрат ориентировались только на рабочие дни, и общая величина трудозатрат в данном случае составила 449,4 чел./ч. Заработная плата начислялась с учетом количества проработанных месяцев (5,26 мес) за 158 сут и составила для двух лаборантов 179066,60 руб., для двух научных сотрудников - 294933,33 руб., что в сумме составило 428999,93 руб.

40 В то же время для иммунизации 5 животных заявляемым способом достаточно всего двух человек: лаборанта и научного сотрудника. Иммунизация длилась 68 сут, из которых 50 сут являлись полными рабочими днями. Трудозатраты на 2 сотрудников составили 86,4 чел./ч, что в 5,2 раз меньше трудозатрат при производстве сывороток способом-прототипом. Заработная плата учитывалась за фактическое количество проработанных мес (68 сут или 2,26 мес) и составила для научного

сотрудника 63280,00 руб., для лаборанта - 3842 0,00 руб., а в сумме - 101700,00 руб. Как видно, использование заявляемого способа позволяет обеспечить экономию фонда заработной платы, то есть снизить его в 4,2 раз.

5 Установлено, что получение риккетсиозных гипериммунных сывороток -  
основного субстрата для приготовления ИДП, с использованием многоточечной  
внутрикожной аппликации риккетсиозных антигенов при первичной иммунизации и  
применением ИЛ-2 при реиммунизации позволяет снизить материальные затраты на  
10 содержание животных-продуцентов и приобретение адъювантов в 4,7 раз, в 5,2 раз  
уменьшить уровень трудозатрат за один производственный цикл получения  
гипериммунных риккетсиозных сывороток, а также снизить фонд заработной платы  
в 4,2 раз.

Таким образом, положительный эффект от использования заявляемого способа  
15 получения риккетсиозных сывороток заключается в следующем:

15 1. Существенно сокращается (в 2,3 раз) время иммунизации животных-продуцентов  
(со 158 сут до 68 сут), снижаются в 4,7 раз материальные затраты на содержание  
животных-продуцентов и приобретение адъювантов, уменьшается в 5,2 раз уровень  
трудозатрат за один производственный цикл получения гипериммунных  
20 риккетсиозных сывороток, снижается в 4,2 раз фонд заработной платы.

2. Полученные гипериммунные сыворотки по накопленным титрам риккетсиозных  
антител в 4-8 раз превосходят сыворотки, полученные с применением способа-  
прототипа.

25 3. Для накопления 1% по белку флюоресцирующих иммуноглобулинов требуется  
иммунизация всего 5 кроликов вместо 20.

4. Заявляемый способ одинаково применим как к сильноиммуногенным (*S.burnetii*  
и *R.prowazekii*), так и к слабоиммуногенным (*R.sibiricd*) возбудителям риккетсиозов.

Заявляемое изобретение удовлетворяет критерию «новизна», так как впервые  
30 предложен способ получения гипериммунных риккетсиозных сывороток, пригодных  
для приготовления иммунобиологических диагностических препаратов, необходимых  
для выявления актуальных в эпидемиологическом отношении возбудителей  
риккетсиозов (*S.burnetii*, *R.prowazekii*, *R.sibiricd*), обеспечивающий за счет  
многоточечной внутрикожной паравертебральной аппликации антигенов при  
35 первичной иммунизации и введения рекомбинантного человеческого ИЛ-2  
(ронколейкина) при реиммунизации стимуляцию более эффективного  
антителообразования у животных-продуцентов и получение риккетсиозных  
сывороток с высокой специфической активностью в существенно более короткие  
40 сроки.

Заявляемое изобретение удовлетворяет критерию «изобретательский уровень», так  
как из доступных источников информации не является очевидным целесообразность  
включения в схему первичной иммунизации животных-продуцентов внутрикожной  
паравертебральной аппликации антигенов, предусматривающей введение в 40 точек  
45 микродоз смеси риккетсиозных антигенов с полным адъювантом Фрейнда,  
использования при реиммунизации рекомбинантного ИЛ-2 человека и его  
оптимальная доза, а также возможность повышения за счет этого уровня титров  
специфических антител в получаемых сыворотках до 1:10240.

50 Соответствие критерию «пригодность для применения» доказывается результатами  
проведенных экспериментальных исследований, из которых видно, что заявляемый  
способ прост в проведении, отличается высокой эффективностью иммунизации,  
достаточной для практического применения в качестве схемы получения кроличьих

гипериммунных сывороток в высоких титрах как к сильно-, так и слабоиммуногенным возбудителям риккетсиозов. Предлагаемый способ позволяет в более короткий срок и с меньшими материальными затратами получать гипериммунные сыворотки (основной субстрат для изготовления риккетсиозных иммунобиологических диагностических препаратов) в производственных масштабах и может быть легко освоен отечественной промышленностью.

#### Источники информации

1. Балашов Ю.С. Кровососущие членистоногие и риккетсии / Ю.С.Балашов, А.Б.Дайтер. - Л.: Наука, 1973. - 251 с.
2. Лобзин Ю.В. Руководство по инфекционным болезням / Ю.В.Лобзин. - СПб.: Фолиант, 2003. - 1040 с.
3. Лукин Е.П. Риккетсиозы: эпидемиологическая оценка / Е.П.Лукин, А.А.Махлай, В.С.Перепелкин // Воен. мед. журн. - 1997. - №8. - С.25-33.
4. Мусабаев И.К. Руководство по риккетсиозам, геморрагическим лихорадкам и энцефалитам / И.К.Мусабаев. - Ташкент: Медицина. - 1986. - 470 с.
5. Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos / S. Phongmany [et al.] // Emerg Infect Dis. - 2006. - Vol.12. - P.256-262.
6. Алексеев В.В. Аэрогенные инфекции в аспекте проблемы биотерроризма / В.В.Алексеев, Н.Г.Тихонов, А.В.Липницкий // Пробл. особо опасн. инф. - Вып.85. - 2003. - С.20-28.
7. Воробьев А.А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия / А.А.Воробьев // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2001. - №6. - С.54-56.
8. Здродовский П.Ф. Учение о риккетсиях и риккетсиозах / П.Ф.Здродовский, Е.М.Голиневич. - М.: Медицина, 1972. - 496 с.
9. Зуева Л.П. Эпидемиология / Л.П.Зуева, Р.Х.Яфаев. - СПб.: Фолиант, 2005. - 752 с.
10. Лобан К.М. Риккетсиозы человека: руководство для врачей / К.М.Лобан, Ю.В.Лобзин, Е.П.Лукин. - СПб.: Элби, 2002. - 474 с.
11. Лукин Е.П. Элементы патогенеза риккетсиозов в свете современных данных / Е.П.Лукин, А.А.Воробьев, А.А.Махлай // Вестник РАМН. - 1999. - №12. - С.7-13.
12. Biological weapons / Kerwat K. [et al.] // Dtsch. Med. Wochenschr. - 2010 - Vol.135, №33. - P.1612-1616.
13. Kagawa F.T. Q fever as a biological weapon / F.T.Kagawa, J.H.Weherner, V.Mohindra // Semin Respir Infect. - 2003. - Vol.18. - P.183-195.
14. Oyston P.C. Q fever: the neglected biothreat agent / P.C.Oyston, C.Davies // J. Med. Microbiol. - 2011. Vol.60, Pt.1. - P.9-21.
15. Дайтер А.Б. Лихорадка Ку. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней / А.Б.Дайтер, И.В.Тарасевич / М.: Медицина. - 1993. - Т.1. - С.333-420.
16. Лобан К.М. Лихорадка Ку / К.М.Лобан. - М.: Медицина, 1987. - 128 с.
17. Новые и возвращающиеся природно-очаговые инфекции и проблемы эндоцитобиоза клещевых микроорганизмов / Н.В.Рудаков // Медицина в Кузбассе. Спец. выпуск №5. - 2008. - С.129-133.
18. Опасные инфекционные заболевания. Учебное пособие / Под ред. В.В.Алексеева. - Волгоград: НП «Здоровье и экология», 2006. - 368 с.
19. Рудаков Н.В. Коксипеллез в Российской Федерации / Н.В.Рудаков, Н.Ф.Фетисова, Т.Г.Сыскова // ЗниСО. - 1994. - №2 (11). - С.10-12.
20. Рудаков Н.В. Современное состояние очагов клещевого риккетсиоза / Н.В.Рудаков, И.Е.Самойленко, С.Н.Шпынов // ЗниСО. - 1998. - №1 (приложение). -

С.12-14.

21. Тарасевич И.В. Риккетсиозы. Природная очаговость болезней: исследования Ин-та Гамалеи РАМН / И.В.Тарасевич, Н.Ф.Фетисова, В.А.Макарова // Ред. Коренберга Э.И. - М.: Русаки, 2003. - С.64-98.
- 5 22. Тарасевич И.В. Коксиеллез (лихорадка Ку) / И.В.Тарасевич // Частная эпидемиология. - М.: Медицина, 2002. - Т.2. - 287 с.
23. Vasa O.G. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions / O.G. Vasa, D.Paretsky // *Microbiol. Rev.* - 1983. - Vol.47. - P.127-149.
- 10 24. Громашевский Л.В. Сыпной тиф / Л.В.Громашевский // Общая и частная эпидемиология. - М.: Медицина, 1973. - Т.2 - 124 с.
25. Инфекционная заболеваемость в Северо-Западном федеральном округе России. Закономерности и особенности эпидемического процесса в современный период. Аналитический обзор. - СПб.: Феникс, 2007. - 216 с.
- 15 26. Тарасевич И.В. Современные представления о риккетсиозах / И.В.Тарасевич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2005. - №2. - Т.7. - С.119-129.
27. Тихонов Н.Г. Лихорадка Ку и сыпной тиф в Волгоградской области / Н.Г.Тихонов, Т.П.Пашанина, В.Ф.Игнатович // Эпидемиол. и инфекц. болезни. - 1999. - №4. - С 12-15.
- 20 28. Токаревич Н.К. Изменение сыпного тифа на протяжении последнего столетия / Н.К.Токаревич, Ф.И.Красник // Тр. Ин-та им. Пастера. - Л., 1975. - Т.43. - С.21-25.
29. Behbehani A.M. Laboratory diagnosis of viral, bacterial and rickettsial diseases / A.M.Behbehani // Springfield (Ill). - 1972. - P.229.
- 25 30. Detection of *Coxiella burnetii* in different biological samples by polymerase chain reaction (PCR) / N.K.Tokarevich [et al.] // American society for rickettsiology - Bartonella as an emerging pathogen group. Big Sky, Montana. - 2001. - P.86.
- 30 31. Fournier P.E. Diagnosis of Q fever / P.E.Fournier, T.J.Marrie, D.Raoult // *J. Clin. Microbiol.* - 1998. - Vol.36, №7. - P.1823-1834.
32. Peruski A.H. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents / A.H.Peruski, L.F.Peruski // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* - 2003. - Vol.10(4). - P.506-513.
- 35 33. Антитела. Методы: Кн. 1: пер. с англ. / Под ред. Д.Кэтти. - М.: Мир, 1991. - 287 с.
34. Антитела. Методы: Кн. 2: пер. с англ. / Под ред. Д.Кэтти. - М.: Мир, 1991. - 384 с.
35. Иммунология / Д.Мейл [и др.] - М.: Логосфера. - 2007. - 556 с.
36. Медуницын Н.В. Цитокины и вакцины / Н.В.Медуницын [и др.] // Медицинская иммунология. - 2001. - Т.3, №3. - С.439-447.
- 40 37. Медуницын Н.В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней / Н.В.Медуницын, В.И.Покровский - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. - 512 с.
38. Ройт А. Иммунология / А.Ройт, Дж.Бростофф, Д.Мейл. - М.: Мир, 2000. - 592 с.
- 45 39. Сепиашвили Р.И. Основы физиологии иммунной системы / Р.И.Сепиашвили. - М.: Медицина. - 2003. - 239 с.
40. Чард Т. Радиоиммунологические методы / Т.Чард. - М.: Мир, 1981. - 248 с.
41. Heath A.W. Cytocines as immunological adjuvants / A.W.Heath, J.H.L. Playfair // *Vaccine.* - 1992. - Vol.10. - P.427-434.
- 50 42. Pasquini S. Cytokines and costimulatory molecules as genetic adjuvants / S.Pasquini [et al.] // *Immunol. Cell Biol.* - 1997. - Vol.75. - №4. - P.397-401.
43. Возианов А.Ф. Цитокины: биологические и противоопухолевые свойства /

А.Ф.Возианов, А.К.Бутенко, К.П.Зак. - Киев.: Наукова думка, 1998. - 317 с.

44. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. / Г.Н.Дранник. - Одесса: АстроПринт. - 1999. - 604 с.

5 45. Никитина Т.Н. Иммуноадьювантное действие цитокинов при иммунизации животных вакциной против гепатита В / Т.Н.Никитина, Ж.И.Авдеева // Цитокины и воспаление. - 2009. - Т.8, №1. - С.28-31.

46. Notria A. Cytokines as potencial vaccine adjuvants / A.Notria, R.H.Rubin // Biotherapy. - 1994. - Vol.7. - P.261-269.

10 47. Авдеева Ж.И. Цитокины и вакцины / Ж.И.Авдеева [и др.] // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2009. - №3. - С.22-27.

48. Перспективы применения ронколейкина в качестве адьюванта вакцин / А.В. Степанов [и др.] - СПб.: Изд. Дом, 2006. - 54 с.

15 49. Influence of recombinant bovine interleukin-1 and interleukin-2 in pigs vaccinated and challenged with Streptococcus suis / F.Blecha [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. - 1995. - Vol.44, №3-4. - P.329-346.

20 50. Intrleukin 2 and protective immunity in Hemophilus pleuropneumoniae. Preliminary studies / G.Anderson [et al.] // In: Vaccines, Cold Spring Harbor Press. - 1987. - Vol.38. - P.22-25.

51. Coimmunization with IFN-gamma or IL-2, but not IL-13, or IL-4 cDNA can enhance Th-1 type DNA vaccine-induced immune responses in vivo / J.J.Kim [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. - 2000. - Vol.20, №3. - P.311-319.

25 52. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV / J.J.Kim [et al.] // J. Interferon Cytokine Res. - 1999. - Vol.19, №1. - P.77-84.

30 53. Intranasal administration of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA vaccine with interleukin-2 expression plasmid enhances cell-mediated immunity against HIV-1 / K.Q.Xin [et al.] // Immunology. - 1998. - Vol.94, №3. - P.438-444.

54. IL-2 enhances the function of recombinant poxvirus-based vaccines in the treatment of established pulmonary metastases / V.Bronte [et al.] // J. Immunol. - 1995. - Vol.154. - P.5282-5292.

35 55. Adjuvant-independent enhanced immune responses to recombinant herpes simplex virus type I glycoprotein D by fusion with biologically active interleukin-2 / M.Hazama [et al.] // Vaccine. - 1993. - Vol.11. - P.629-636.

40 56. Adjuvant effects of low dose interleukin-2 on antibody response to influenza virus vaccination in healthy elderly subjects / M. Provincial [et al.] // Mech. Aging Dev. - 1994. - Vol.77. - P.75-82.

57. Козлов В.К. Коррекция дисфункций иммунной системы Ронколейкином / В.К.Козлов, М.Ф.Лебедев, В.Н.Егорова // Terra Medica. - 2001. - №2. - С.12-14.

58. Коррекция иммунореактивности рекомбинантным интерлейкином-2: пособие для врачей / В.К.Козлов [и др.]. - СПб.: Изд. СПбГУ, 2001. - 24 с.

45 59. Инструкция по изготовлению и контролю иммуноглобулина люминесцирующего диагностического к риккетсиям группы клещевой пятнистой лихорадки мышинного сухого / Р.Б.Гольдин [и др.] // Утверждена начальником Научно-исследовательского института военной медицины 24.12.1982. - Л.: [Б.и.], 1982. - 40 с.

50 60. Инструкция по изготовлению и контролю иммуноглобулинов диагностических риккетсиозных полигрупповых люминесцирующих кроличьих сухих / Р.Б.Гольдин [и др.] // Утверждена начальником Научно-исследовательского института военной медицины 18.06.1986. - Л.: [Б.и.], 1986. - 96 с.

61. Лабораторный регламент получения иммуноглобулинов диагностических риккетсиозных полигрупповых люминесцирующих кроличьих сухих, №170 / Р.Б.Гольдин [и др.] // Утвержден Председателем КВС при Минздраве СССР 10.02.1981. - 1980. - Л.: [Б.и.], - 48 с.

5 62. Лабораторный регламент получения сухой люминесцирующей кроличьей сыворотки для выявления риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки №338-73 / З.М.Прусакова [и др.] // Утвержден Председателем КВС при Минздраве СССР 05.06.1973-1973. - Л.: [Б.и.], - 79 с.

10 63. Белова О.В. Иммунологическая функция кожи и нейроиммунокожная система / Белова О.В., Арион В.Я. // Аллергология и иммунология. - 2006. - Т.7, №4. - С.492-497.

64. Niyonsaba F. Human defensins and cathelicidins in the skin: beyond direct antimicrobial properties / Niyonsaba F., Nagaoka I., Ogawa H. // Crit Rev Immunol. - 2006. - №26 (6). - P.545-547.

15 65. The Skin Immune System (SIS): Distribution and Immunophenotype of Lymphocyte Subpopulations in Normal Human Skin / J.D.Bos [et al.] // Journal of Investigative Dermatology. - 1987. - №88. - P.569-573.

20 66. Schaubert J. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system / J.Schauber, R.L.Gallo // J Allergy Clin Immunol. - 2008. - №122 (2). - P.261-266.

67. Егорова В.Н. Новые возможности иммунотерапии с использованием Ронколейкина - рекомбинантного интерлейкина-2 человека / В.Н.Егорова, М.Н.Смирнов // Terra Medica. - 1999. - №2. - С.15-17.

25 68. Нечаева А.С. Практическое руководство по производству гамма-глобулина / А.С.Нечаева, Н.А.Пономарева. - М.: Медицина, 1956. - 67 с.

30

35

40

45

50

Таблица 1

Результаты сравнительной оценки в прямом методе флюоресцирующих антител (НМФА) обратных величин уровней (титров) специфической активности риккетсиозных кроличьих сывороток (медианы), полученных заявляемым способом и способом-прототипом

Вид возбудителя	Уровень (титр) специфической активности полученных кроличьих сывороток		Длительность схемы иммунизации в зависимости от применяемого способа, сут	
	Заявляемый способ	Способ-прототип	Заявляемый способ	Способ-прототип
<i>C. burnetii</i>	10240 (10240÷10240)*	1280 (1280÷2560)	68	158
<i>R. prowazekii</i>	10240 (5120÷10240)*	1280 (1280÷2560)	68	158
<i>R. sibirica</i>	5120 (2560÷5120)*	960 (640÷1280)	68	158

Примечание. \* – различия достоверны ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению со способом-прототипом



Таблица 2

Среднегеометрические количественные показатели  $\gamma$ -глобулиновых фракций, выделенных из риккетсиозных кроличьих сывороток, полученных с применением заявляемого способа и способа-прототипа

Применяемый способ получения риккетсиозных сывороток	Характеристики подвергнутых фракционированию сывороток		Характеристики выделенных $\gamma$ -х фракций		
	Объем, мл	Содержание белка, %	Объем, мл	Содержание белка, %	Выход по белку, %
Заявляемый способ	723,45±14,21	6,67±0,72	72,0±1,52	6,3±0,75	24,91±1,44
Способ-прототип	353,71±13,44	10,28±0,19	51,28±1,38	18,14±0,93	12,11±1,53

Таблица 3

Расчет затрат, связанных с проведением способа-прототипа и заявляемого способа получения риккетсиозных кроличьих сыворотов

Применяемый способ получения риккетсиозных сыворотов	Кол-во животных	Стоимость одного кролика, руб.	Стоимость корма, руб./сут	Стоимость адьювантов на одного кролика, руб.	Длительность цикла иммунизации, сут.	Общая стоимость иммунизации, руб.
Заявляемый способ	5	1485,70	17,20	1082,50	68	18689,00
Способ-прототип	20	1485,70	17,20	137,50	158	89566,00

Таблица 4

Расчет суточной потребности в кормах для кроликов-самцов массой 2,5-3,5 кг

Наименование корма	Суточная потребность, г	Цена за кг, руб.	Стоимость суточной нормы корма фактическая, руб.
1 Комбикорм	200,00	18,00	3,60
2 Дрожжи	0,40	20,00	0,01
3 Рыбий жир	0,40	280,00	0,11
4 Свёкла	60,00	30,00	1,80
5 Морковь	120,00	40,00	4,80
6 Сено	90,00	6,00	0,54
7 Зеленая масса овса	450,00	8,00	3,60
8 Трава	450,00	6,07	2,73
9 Соль	1,00	10,00	0,01
Итого:	1371,80	418,00	17,20

Таблица 5

Величины трудозатрат и заработной платы сотрудников, принимающих участие в производственном цикле получения риккетсиозных кроличьих сывороток при использовании заявляемого способа и способа-прототипа

Применяемый способ получения риккетсиозных сывороток	Кол-во лаборантов, чел.	Кол-во научных сотрудников, чел.	Длительность цикла иммунизации, сут	Кол-во рабочих дней	Общая величина трудозатрат, чел./ч	Заработная плата лаборанта/научного сотрудника, руб.	Общая заработная плата, руб.
Заявляемый способ	1	1	68	50	86,4	38420,00 / 63280,00	101700,00
Способ-прототип	2	2	158	116	449,4	179066,60 / 294933,33	428999,93

### Формула изобретения

Способ получения гипериммунных риккетсиозных сывороток, пригодных для

приготовления иммунобиологических диагностических препаратов, предназначенных для выявления актуальных в эпидемиологическом отношении возбудителей риккетсиозов - *R.prowazekii*, *S.burnetii*, *R.sibirica*, предусматривающий двухэтапную

5 схему иммунизации кроликов-самцов породы «Шиншилла» 10-12-месячного возраста массой 2,5-3,0 кг - первичную иммунизацию и реиммунизацию - с использованием при первичной иммунизации смеси 10% суспензии инфекционного риккетсиозного

10 материала и полного адьюванта Фрейнда, взятых в определенных объемах и при определенном соотношении, применение в качестве инфекционного риккетсиозного материала гомогенизированных оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, инфицированных *R.prowazekii*, или гомогенизированных селезенки беспородных белых

15 мышцей массой 16-18 г, инфицированных риккетсиями вида *S.burnetii* или *R.sibirica*, предусматривающий начало этапа реиммунизации при снижении титров антител, продуцированных в результате первичной иммунизации, до 1:20-1:80 и тотальный забор крови для приготовления сывороток после окончания циклов иммунизации, отличающийся тем, что при первичной иммунизации вводят смесь 10% суспензии

20 инфекционного риккетсиозного материала, взятую в объеме 0,5 мл, и полного адьюванта Фрейнда, взятого в объеме 0,75 мл, то есть в 1,5 раза превышающем объем инфекционного материала, вводят указанную смесь однократно внутривенно микродозами паравертбрально в 40 точек, последующий этап реиммунизации начинают через 45 суток с использованием при этом инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов, для чего осуществляют четырехкратно

25 внутривенно инъекции инактивированного антигена соответствующего возбудителя риккетсиоза для реакции связывания комплемента в концентрации не менее 4 антигенных единиц в 1 мл и в возрастающих дозах, составляющих 1,0, 1,5, 2,0 и 2,5 мл, с интервалом после каждого введения антигена 3 сут, причем на этапе реиммунизации наряду с внутривенными инъекциями инактивированных антигенов соответствующих

30 возбудителей риккетсиозов дополнительно подкожно вводят рекомбинантный ИЛ-2 человека - ронколейкин - в объеме 1,0 мл и в дозе 250000 МЕ, тотальный забор крови для приготовления сывороток осуществляют на 14 сут после последней внутривенной инъекции инактивированных антигенов соответствующих возбудителей риккетсиозов и при титрах специфических антител в непрямом методе флюоресцирующих антител

35 не ниже 1:5120-1:10240, а продолжительность полного цикла иммунизации составляет 68 сут.

40

45

50