

эмульсию. При проверке на птице такая вакцина является безвредной и ареактогенной, достаточно свободно инъецируется при прогревании до $+(18-22)^{\circ}\text{C}$. При исследовании уровня накопления в сыворотке крови иммунизированной птицы специфических антител можно утверждать о высокой антигенной активности нашего препарата. Данный вывод был сделан на основе полученных результатов исследования: СГТ антител составил $6,8 \pm 0,58 \log_2$ (для первой группы) и $6,4 \pm 0,87 \log_2$ (для третьей группы) на 14 суток после вакцинации, на 28 суток - $11,4 \pm 0,4 \log_2$ и $8,2 \pm 1,32 \log_2$ (для первой и третьей групп соответственно), и $10,8 \pm 0,49 \log_2$ и $10,4 \pm 0,5 \log_2$ (для второй и четвертой группы).

Список литературы

1. Коровин, Р.Н. Основы профилактики вирусных болезней птиц / Р.Н.Коровин, Б.Б. Трефилов, Н.Д. Придыбайло // Новое в эпизоотологии, диагностике и профилактике инфекционных и незаразных болезней птиц в промышленном птицеводстве: материалы международной юбилейной научно-практической конференции, посвященной 40-летию ВНИВИП, СПб.: изд-во СПбГАВМ, 2004. – С. 34 – 42.
2. Специфическая иммунопрофилактика и иммунотерапия инфекционных заболеваний : учеб.-метод. пособие / Т. А. Канашкова [и др.]. – Минск : БГМУ, 2009. – 84 с.
3. Михалишин, В.В. Адьюванты и их использование / В.В. Михалишин, Н.С.Мамков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных: Материалы международной научной конференции «Инфекционная патология животных», посвященной 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ», ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных». - Т. 4. – Владимир: Изд-во ООО «Транзит-ИКС», 2008. – С. 340 – 371.
4. Горский, Б.В. Основы общей ветеринарной вирусологии / Б.В.Горский, Г.Г.Нуриев, Н.К. Гумеров. – М.: Колос, 1978. – 192 с.
5. Сюрин, В.Н. Руководство по ветеринарной вирусологии / В.Н. Сюрин [и др.]: под общей редакцией В.Н. Сюрин. – М.: Колос, 1966. – 687 с.

УДК: 619:615.371:616.98:579.842.14-084

АНТИГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ АДЬЮВАНТОВ И ОЦЕНКА ЕЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ.

Амосова Л.А., аспирант, Карлович В.К., младший научный сотрудник
Научный руководитель Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск

Антигены, представленные инактивированными микроорганизмами, а также антигены, полученные путем использования химических веществ, как правило, вызывают краткосрочный иммунный ответ. Этого можно избежать за счет применения особых веществ – адьювантов. Для усиления иммунного ответа, помимо адьювантов, применяют определенные схемы вакцинации (убывающие или возрастающие дозы), различную кратность, сроки ревакцинации. Это в определенной степени моделирует динамику поступления антигенов при естественном течении болезни и способствует формированию более длительной иммунологической памяти [1, 2].

Наиболее применяемыми адьювантами являются депонированные (соли

алюминия и кальция), эмульгированные (водно-масляные). Механизм их действия основывается на усилении иммунного ответа за счет замедления выхода антигена из места введения и увеличения периода его контакта с макрофагами или другими чувствительными клетками. Антигены, медленно высвобождаясь, длительное время сохраняются в высокой концентрации в месте введения. Это приводит к тому, что антигенообразующие плазмocyты вырабатываются в больших количествах и в течение более длительного периода, чем при введении той же дозы антигена без адьюванта [3].

При разработке схемы вакцинации, следует учитывать тот факт, что образование антител против антигенов, адсорбированных на солях алюминия, является относительно кратковременным: так, титры антител быстро понижаются через 3 — 4 недели после введения антигена [4]. Этот недостаток можно преодолеть путем повторной вакцинации. Несмотря на местное сохранение антигена, он быстро перестает действовать как стимулятор механизма образования антител: этим алюминиевые адьюванты отличаются от водно-масляных, обладающих гораздо более продолжительным действием [3].

Цель исследования: сравнительная оценка влияния различных типов адьювантов на антигенные и иммуногенные (протективные) свойства вакцины против сальмонеллеза животных.

Для осуществления данной цели поставлены следующие задачи:

- приготовить эмульсионный и сорбированный образцы вакцины;
- проверить безвредность и реактогенность и иммунологические свойства образцов на лабораторных животных;
- сравнить протективные свойства сорбированного образца вакцины на основе поверхностных антигенов с образцом на основе цельных клеток сальмонелл.

Методы исследования.

Исследования проводили в два этапа.

На первом этапе исследований изучали иммунологические свойства экспериментальных образцов вакцины против сальмонеллеза животных на основе поверхностных антигенов с использованием различных типов адьювантов. Изготовили три образца вакцины: №1 - эмульсионный с использованием ISA-70 (соотношение антиген:адьювант — 30:70), №2 - эмульсионный с использованием адьюванта «Montanide» ISA-206 (соотношение 50:50), №3 - сорбированный, с использованием 6%-ного геля гидроокиси алюминия (соотношение 88:12). Образец №1 представлял собой эмульсию типа вода-масло, полученную гомогенизацией Braun Turbo 600 при 3000 об/мин 5-7 мин. Образец №2 - эмульсию типа вода-масло-вода, полученную в результате гомогенизации при 1000 об/мин в течение 10 мин, с учетом температуры обеих фаз 37°C; Стабильность эмульсий оценивали путем центрифугирования при 3000 об/мин 30 мин, учитывая наличие либо отсутствие расслоения водной и масляной фазы.

Для определения безвредности образцы вводили подкожно белым мышам, наблюдение вели в течение 10 суток. Реактогенность образцов определяли в тесте на лапках. Опыты по оценке антигенных и иммуногенных свойств полученных образцов проводили на белых мышах массой 14-16 г и морских свинках массой 250-300 г. Сформировали три опытных и одну контрольную группы белых мышей. Иммунизацию каждым образцом проводили двукратно с интервалом 10 дней подкожно в объеме 0,3 см³.

Морских свинок сформировали в три группы по 3 головы в каждой. Первую группу иммунизировали подкожно однократно в объеме 1,0 см³ образцом № 1, вторую - однократно образцом № 2; третью - двукратно образцом № 3 (6%-ный гель ГОА 88:12). Учитывали общее состояние животных и реакцию на месте введения после вакцинации.

Второй этап опытов заключался в сравнительной оценке антигенных и протективных свойств сорбированного образца вакцины № 3 на основе поверхностных антигенов с образцом на основе цельных клеток сальмонелл.

Белых мышей иммунизировали экспериментальным (№ 3) и цельноклеточным образцами вакцины двукратно.

Морских свинок иммунизировали образцом № 3 подкожно 0,5 см³ в нативном состоянии и в разведениях 1:2, 1:4, а также цельноклеточным образцам вакцины.

На 12-й день после второй иммунизации часть белых мышей декапитировали для получения сыворотки крови, остальные группы разделили на три и заразили 4 ЛД₅₀ *Sal. choleraesuis*, *Sal. dublin* и *Sal. typhimurium*. Учет павших животных вели в течение 10 дней. Кровь у морских свинок для определения титра антител в РА отбирали на 12-е сутки после первой и 14-е, 21-е после второй иммунизации.

Результаты и их обсуждение

Образцы вакцины, приготовленные с использованием ISA-206, и ISA-70 представляют собой стабильную эмульсию белого цвета; с ГОА — прозрачную жидкость соломенно-желтого цвета с осадком на дне, легко разбивающимся при встряхивании.

Иммунизированные лабораторные животные оставались клинически здоровыми на протяжении всего периода наблюдения, в месте введения эмульсионных образцов у 10% белых мышей под кожей наблюдали подвижное образование, с маслянистым содержимым белого цвета, у морских свинок местных изменений не выявлено. При введении сорбированных образцов у 20% белых мышей обнаружено частичное выпадение шерсти припухлость в области холки, со временем рассасывающаяся. Образцы оказались умеренно реактогенными, индекс реактогенности сорбированного образца составил 43%, эмульсионных — не превышал 40%.

Таблица 1 - Оценка антигенности и протективности (иммуногенности) различных адьювантных композиций вакцины против сальмонеллеза животных

| Композиция антигена (1:2) с различными адьювантами | титры агглют-в в РА, log ₂ | | | % выживших при заражении 4 ЛД ₅₀ , % | | |
|--|---------------------------------------|-------------|--------------|---|-------------|--------------|
| | <i>S.d.</i> | <i>S.t.</i> | <i>S.ch.</i> | <i>S.d.</i> | <i>S.t.</i> | <i>S.ch.</i> |
| ISA-206 (50:50) | 6,0 | 4,0 | 5,0 | 75 | 50 | 75 |
| ISA-70 (30:70) | 4,0 | 5,0 | 4,0 | 50 | 50 | 75 |
| ГОА (88:12) | 9,0 | 10,0 | 9,0 | 75 | 75 | 100 |

Результаты изучения антигенной активности и иммуногенности образцов вакцины против сальмонеллеза животных (табл. 1) показывают, что пятидесятипроцентной защите белых мышей при заражающей дозе 4 ЛД₅₀ соответствует уровень специфических агглютининов 4-5 log₂. Следует отметить, что образцы характеризуются различным соотношением составных частей антиген:адьювант: титр специфических антител возрастает пропорционально содержанию антигенов в образце. В образце № 3 наибольшее количество антигенной части, и в сыворотке крови отмечен самый высокий титр. Эта зависимость может быть связана и с доступностью антигена. Например, при использовании в качестве адьюванта ГОА, антиген быстро и в больших количествах связывается с иммунокомпетентным клетками. Адьювант ISA-70 образует эмульсию типа вода-масло, что обеспечивает медленное высвобождение антигена, соответственно более низкий титр антител на данном этапе исследований. Адьювант ISA-206 способен образовывать эмульсию типа вода-масло-вода, для которой характерно как быстрое, так и медленное высвобождение антигена. Установлено, что наибольшими протективными свойствами обладает сорбированный образец.

Таблица 2 - Оценка специфической реактивности сывороток крови морских свинок, иммунизированных различными адьювантными композициями вакцинного препарата на основе поверхностных протективных антигенов сальмонелл

| Композиция антигена с различными адьювантами | Период. (сутки) | титры агглют-в в РА, log ₂ | | |
|--|-----------------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| | | <i>S.d.</i> | <i>S.t.</i> | <i>S.ch.</i> |
| ISA-70 однократно | 12 | 12,0 | 11,0 | 13,0 |
| | 26 | 14,0 | 13,0 | 15,0 |
| | 35 | 15,0 | 14,0 | 16,0 |
| ISA-206 однократно | 12 | 10,0 | 9,0 | 14,0 |
| | 26 | 13,0 | 12,0 | 15,0 |
| | 35 | 13,5 | 13,0 | 15,0 |
| ГОА двукратно | 12 | 13,0 | 10,0 | 12,0 |
| | 26 | 15,0 | 13,0 | 15,0 |
| | 35 | 15,0 | 15,0 | 15,0 |

Испытание антигенной активности экспериментальных образцов вакцины на морских свинок показало, что однократная вакцинация (12-й день) как эмульсионными, так и сорбированным образцами вызывает наработку высокого уровня антител. Как видно из таблицы 2, после второй вакцинации (26-й день) образцом №3 уровень антител возрос на 2-3 log₂. На 35-й день исследования уровень антител оставался высоким независимо от используемого адьюванта.

Дальнейшие исследования проводили, используя сорбированный образец вакцины, включающий поверхностные протективные антигены, сравнивая его с цельноклеточным.

Таблица 3 - Оценка специфической реактивности сыворотки крови морских свинок, иммунизированных различными разведениями сорбированного образца вакцины против сальмонеллеза животных

| Разведение образца вакцины | Период. (сутки) | титры агглют-в в РА, log ₂ | | |
|----------------------------|-----------------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| | | <i>S.d.</i> | <i>S.t.</i> | <i>S.ch.</i> |
| нативный | 12 | 6,8 | 6,0 | 7,0 |
| | 26 | 12,5 | 11,2 | 12,5 |
| | 35 | 9,5 | 11,0 | 11,5 |
| 1:2 | 12 | 6,5 | 5,0 | 6,5 |
| | 26 | 9,0 | 8,5 | 9,0 |
| | 35 | 6,5 | 7,0 | 8,0 |
| 1:4 | 12 | 5,0 | 6,0 | 6,0 |
| | 26 | 9,0 | 8,0 | 8,0 |
| | 35 | 6,5 | 7,0 | 7,5 |
| цельноклеточный | 12 | 9,0 | 6,0 | 10,0 |
| | 26 | 17,5 | 13,5 | 14,0 |
| | 35 | 14,0 | 12,0 | 13,5 |

Иммунный ответ на введение сорбированного образца вакцины развивался закономерно. Пик образования антител пришелся на 12-е сутки после второй вакцинации. На 26-е сутки отмечено некоторое падение титров, однако он остался на достаточно высоком уровне. Кроме того показатель изменялся в зависимости от разведения препарата: нативный образец обеспечивает высокое накопление специфических антител против сальмонелл и их сохранение на протяжении не менее 35 дней. Наиболее высокие титры получены при использовании цельноклеточного образца, что объясняется тем, что в клетке содержится полный набор антигенных субстанций, способных вызвать образование антител. Однако не все они участвуют в формировании активной защиты.

Установлено, что образец вакцины против сальмонеллеза животных № 3 защищает лабораторных животных от заражения соответствующими штаммами. Образец с использованием поверхностных антигенов обладает более выраженными протективными свойствами по сравнению с цельноклеточным, так как обеспечивает выживаемость 75-100% инфицированных животных, тогда как количество выживших при использовании образца на основе антигенов, представленных цельными клетками сальмонелл, не превышает 75%.

Заключение

Полученные сорбированный и эмульсионные образцы вакцины против сальмонеллеза оказались безвредными и умеренно реактогенными для лабораторных животных.

Установлено, что пятидесятипроцентной защите белых мышей при заражающей дозе 4 ЛД₅₀ гомологичных штаммов соответствует уровень специфических антител 4-5 log₂. Сорбированный образец обладает более выраженными протективными свойствами для белых мышей по сравнению с эмульсионным.

Результаты иммунизации морских свинок показали, что при использовании ГОА, в качестве адьюванта, титр антител был таким же высоким, как и при использовании эмульсий типов вода-масло или вода-масло-вода.

Сорбированные образцы вакцины с использованием поверхностных антигенов обладают большей протективностью по сравнению с цельноклеточным.

Список литературы

1. Макаров, В.В. Основы инфекционной иммунологии / В.В. Максимович, А.А. Гусев, Е.В. Гусева, О.И. Сухарев. – Владивосток-Москва: издательство «Фолиант», 2000. – 176 с.
2. Медуницын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницын. – М., «Триада-Х», 1999. – 276 с.
3. Шемельков, Е.В. Антигенная активность вакцины против инфекционных болезней свиней при включении в ее состав адьювантов / Е.В. Шемельков, Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 4.
4. Holt, L. V. Quantitative studies in diphtheria prophylaxis: the second response / L. V. Holt // *Br. J. Exp. Pathol.* – 1950. – Apr:31(2):233-41.