

АДЬЮВАНТ MONTANID ISA 70 VG ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА ПТИЦ H5N2

Минчук Ю.П., Згировская А.А.

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

Вирус гриппа птиц относится к списку «А» по классификации Международного эпизоотического бюро. Из-за учащения эпизоотических вспышек и появления случаев заболевания людей, Всемирная организация здравоохранения рекомендует разработку инактивированных вакцин для профилактики данной болезни при угрозе ее возникновения [1].

На современном этапе развития птицеводства вакцинация является важным, а порой, и основным методом защиты от многочисленных инфекционных заболеваний. При создании вакцин значительное внимание уделяется регуляции их иммунологической реактивности с помощью неспецифических веществ, которые потенцируют действие специфических препаратов, способствуя выработке напряженного иммунитета. Вещества различной природы или композиции веществ, которые при совместном введении неспецифически усиливают иммунный ответ на антиген называются адьювантами (от лат. – «помогать») [2]. При использовании адьювантов в вакцинном деле можно уменьшить число инъекций вакцины, а так же значительно снизить количество вводимого в ее состав антигена.

Молекулами, вызывающими формирование специфической невосприимчивости к инфекционному заболеванию, являются протективные антигены возбудителя, введенные в состав вакцин. Тип последних и наличие адьюванта имеют существенное значение в распределении антигенов в организме.

Как указывалось, адьювантами могут быть вещества различной природы. В практике вакцинации используют несколько типов этих веществ. По происхождению различают минеральные; растительные (сапонины); микробные структуры: корпускулярные, субединичные - компоненты клеточной стенки (мурамилдипептид), липополисахариды (пирогенал, продигозан), рибосомальные фракции, нуклеиновые кислоты; цитокины и пептиды тимусного и костномозгового происхождения; синтетические (полиэлектролиты, полинуклеотиды); искусственные адьювантные системы (липосомы, микрочастицы).

По поводу действия адьювантов существуют различные точки зрения. Некоторые считают, что оно заключается в неспецифическом влиянии на организм, другие – что адьюванты изменяют физические свойства антигена, тем самым повышая его иммуногенность. Но большая часть вирусологов полагает, что иммуногенез стимулируется как непосредственным воздействием на организм (усиление воспалительной и плазмоцитарной реакции, повышение общей иммунологической реактивности, синтез белка и нуклеиновых кислот), так и изменением физико-химического состояния антигена (агрегатной структуры, молекулярной массы, полимерности, растворимости и др.), что влияет на условия его захвата макрофагами и приводит к депонированию в организме. При этом активизируются и специфические, и неспецифические факторы защиты [3].

Адьюванты имеют несколько механизмов действия:

- ✓ Благодаря изменению свойств антигена создается его депо и замедляется выведение из организма, повышается иммуногенность;
- ✓ Адьюванты замедляют расщепление антигенных молекул и обеспечивают более длительное и эффективное представление их иммунокомпетентным клеткам (ИКК);
- ✓ Адьюванты способствуют привлечению иммунокомпетентных клеток в область

- локализации антигена и принимают участие в непосредственной доставке его антиген-представляющим клеткам (АПК): макрофагам, дендритным клеткам; усиливают переработку и презентацию антигенов вакцины В- и Т-лимфоцитам;
- ✓ Управляют интенсивностью иммунного ответа, стимулируя локальные воспалительные реакции и активируя иммунокомпетентные клетки на ранних этапах (усиление пролиферации и дифференциации ИКК), улучшают кооперацию ИКК при ответе на вакцину;
 - ✓ Входящие в состав вакцин адьюванты влияют на тип иммунного ответа, программируя АПК на стимуляцию Т-клеток, в том числе и Т-клеток памяти, способствуют увеличению продукции антител, накоплению клонов специфических Т- и В-лимфоцитов.

Кроме положительных, применение адьювантов имеет и некоторые отрицательные моменты. Многие из них являются реактогенными и приводят к появлению в месте их введения и в регионарных лимфатических узлах сильных воспалительных реакций. Некоторые способны повышать сенсибилизирующие свойства вакцин. Часто высокореактогенные вещества обладают наилучшими адьювантными свойствами. Поэтому в ветеринарии при высокой вероятности возникновения эпизоотической ситуации на первое место порой ставят протективные качества вакцин, несмотря на их способность вызывать воспаление тканей в области введения. Такие препараты используют в случаях, когда необходимая защита против заболевания, по сравнению с другими препаратами, достаточно велика, чтобы оправдать некоторые побочные эффекты. Однако с развитием науки обнаруживается все большее количество веществ, обладающих свойствами адьювантов, и, к тому же, являющихся безопасными и полностью выводящимися из организма. По сравнению с вакцинами для людей, в ветеринарных вакцинах, где токсикологические критерии менее строгие, выбор адьювантов более широкий.

При изготовлении вакцины тщательно подбирают ее компоненты (в том числе и адьювант), учитывая вид, возраст и особенности животных или птицы, для которых она предназначена, вид антигена, способ введения, тип иммунного ответа, необходимую длительность иммунитета. Нужно отметить, что не существует универсальных адьювантов, и применение одного из них зависит от требуемого эффекта.

Для создания профилактических препаратов для животных наиболее широко применяют гидроксид алюминия, минеральные и растительные масла.

Масляные адьюванты при создании эмульсионных вакцин с целью повышения их иммуногенной активности стали применять после исследований Фрейнда в 60-х годах 20-го века. В таких вакцинах антиген находится в водной фазе. При смешении с масляным адьювантом происходит его диспергирование с образованием эмульсионных систем: «вода-масло», «масло-вода» или «вода-масло-вода».

Первыми масляными адьювантами были полный и неполный адьюванты Фрейнда. Полный адьювант представляет собой смесь минерального масла, эмульгатора и убитых микобактерий. Неполный – соединение масла и эмульгатора. При смешении такого адьюванта с водной фазой антигена происходит образование эмульсии типа «вода-масло». В данной эмульсии антиген корпускулирован и представляет собой мельчайшие капельки, что изменяет условия захвата его макрофагами, способствует депонированию в организме.

В настоящее время широкое распространение приобрели масляные адьюванты фирмы «Seppic» (Франция), состоящие из масла (минеральное, неминеральное, либо их сочетание) и эмульгатора. Они подходят для применения в вакцинах для различных видов животных, адаптированы к различным типам антигенов и типам иммунного ответа. Адьювант выбирается в зависимости от того, эмульсию какого типа необходимо приготовить. Эмульсии «вода в масле» являются эмульсиями с непрерывной масляной фазой. Это эффективные адьюванты, которые способствуют

выработке длительного иммунитета, образуют стабильную эмульсию, имеющую низкую вязкость. Эмульсии «вода-масло-вода» являются эмульсиями с непрерывной водной фазой, внутри которой капельки масла содержат вторичную водную фазу. Они хорошо переносятся, обладают хорошей текучестью и, благодаря своей структуре, могут вызывать и кратковременный, и длительный иммунитет одновременно. Препарат «масло-вода» обладает высокой текучестью и хорошо переносится. Он вызывает сильный кратковременный иммунный ответ.

Перед нами стояла задача – изготовление эффективной инактивированной вакцины против гриппа птиц H5N2. Для этого мы применили масляный адъювант марки Montanide ISA-70 VG.

Материалы и методы исследования.

Для повышения иммуногенности препарата было решено использовать масляный адъювант марки Montanide ISA-70 VG производства фирмы «Seppic» (Франция). Он предназначен для изготовления эмульсии типа вода в масле. Адъювант Montanide ISA-70 VG включает минеральное масло и эмульгаторы, основанные на манните и очищенной олеиновой кислоте.

В качестве антигена использовали вируссодержащую экстраэмбриональную жидкость, полученную путем заражения 9-тисуточных куриных эмбрионов, с исходным инфекционным титром вируса гриппа H5N2 7,0 lg ЭИД_{50/мл}, и гемагглютинирующей активностью 8 log₂ (1:256). Вирус инактивировали с помощью 0,1% формалина или 0,2% теотропина в течение 24 часов при 37°C.

Стабильный препарат получали, соединяя антиген с масляным адъювант в соотношении 30%:70% по массе. Два компонента интенсивно смешивали, для чего использовали гомогенизатор марки Braun MR 6550 M CA. К адъюванту добавляли водную фазу при скорости перемешивания 1000 об./мин., и увеличивали скорость вращения вилта до 4000 об./мин., гомогенизируя 3 минуты для получения однородной эмульсии белого цвета.

Полученную вакцину исследовали на стабильности эмульсии. Для этого образец центрифугировали при 3000 об./мин. 30 минут – эмульсия оставалась стабильной, без расслоения. Контроль качества и стабильности эмульсии проводили, выдерживая образцы вакцины при различных температурах. Согласно наставлению производителя по применению адъюванта, эмульсия должна оставаться стабильной при +37°C в течение 15 суток при соблюдении всех параметров ее изготовления. Образцы вакцины, выдержанные 15 суток при данной температуре, оставались гомогенными, в некоторых флаконах происходило отделение маленьких капель водной фазы на дне, что является не критическим недостатком. При выдерживании при +37°C 25 суток и более происходило отделение на поверхности прозрачного слоя масла, что так же является не критическим недостатком. Однородность эмульсии восстанавливалась при встряхивании. При +(4-8)°C эмульсия оставалась стабильной в течение всего срока наблюдения (6 месяцев).

Для проверки антигенной активности вакцины в качестве биологического объекта использовали цыплят в количестве 25 голов, серонегативных к вирусу гриппа типа А. Были сформированы пять групп цыплят по 5 голов в каждой. Птице первых 4-х групп в 10-дневном возрасте подкожно в области средней трети шеи вводили исследуемую инактивированную вакцину в объеме 0,5 мл, в которой для инактивации вируса гриппа использовался формалин в 0,1%-й концентрации (1-я и 2-я группы) или теотропин в 0,2%-й концентрации (3-я и 4-я группы). Через 14 дней после первичной иммунизации цыплятам второй и четвертой групп (в каждой – по 5 голов) повторно вводили испытуемые препараты, птица 1-й и 3-й группы повторно не вакцинировалась. Цыплят пятой контрольной группы не вакцинировали.

Антигенную активность вакцины оценивали по уровню накопления в сыворотке крови иммунизированной птицы специфических антител. Для этого за сутки до

вакцинации. на 14 и 28 сутки после введения препарата отбирали кровь как у привитых, так и у контрольных цыплят. Сыворотку исследовали в реакции торможения геммагглютинации (РТГА) на наличие специфических антител. РТГА ставили одновременно в планшетах для иммунологических реакций по общепринятой методике, предварительно освободив сыворотки от термолабильных ингибиторов прогреванием [4, с. 181 – 183; 5]. Определяли средний геометрический титр (СГТ) антител для каждой группы цыплят, который выражали отрицательным логарифмом при основании 2. Полученные показатели переводили в числовые выражения СГТ антител [5, с. 169 – 173, 180].

Было проведено исследование вакцины на безвредность. Ее контролировали путем введения цыплятам подкожно в среднюю треть шеи двукратной дозы вакцины в объеме 1,0 мл. За данной группой вели наблюдение 20 суток с момента введения. В течение указанного времени у цыплят не было выявлено клинических признаков болезни и патологических изменений. При исследовании места введения вакцины не было обнаружено уплотнений, абсцессов и других местных реакций.

Результаты и обсуждение.

Согласно литературным данным, вакцина против гриппа птиц считается эффективной, если приводит к выработке антител, выявляемых в РТГА. Средний защитный геометрический титр таких антител в сыворотке крови должен быть не ниже $4,0 \log_2$. При постановке РТГА были получены следующие результаты (таблица).

Таблица - Показатели СГТ антител в сыворотке крови цыплят, вакцинированных против вируса гриппа птиц H5N2

№ группы цыплят	Отрицательный логарифм СГТ антител, $\log_2$	СГТ антител
1 группа, 14сут. после вакцинации	$6,8 \pm 0,58^*$	1:112
1 группа, 28сут. после вакцинации	$11,4 \pm 0,4^*$	1:2702
2 группа, 14сут. после 2-й вакцинации	$10,8 \pm 0,49^*$	1:1780
3 группа, 14сут. после вакцинации	$6,4 \pm 0,87^*$	1:84
3 группа, 28сут. после вакцинации	$8,2 \pm 1,32^*$	1:294
4 группа, 14сут. после 2-й вакцинации	$10,4 \pm 0,5^*$	1:1350
5 группа, вакцина не вводилась	-	-

* - $p < 0,001$

Исходя из результатов, предоставленных в таблице, можно сделать вывод, что изготовленная нами вакцина вызывает выработку специфических антител против вируса гриппа птиц в высоких титрах как при однократной, так и при двукратной вакцинации цыплят в возрасте 10 суток.

На 14 день после иммунизации титр антител возрастает выше минимального защитного титра (то есть отрицательный логарифм СГТ антител возрастает выше $4,0 \log_2$) и составляет $6,8 \pm 0,58 \log_2$ для первой группы и $6,4 \pm 0,87 \log_2$ для третьей группы. Через 28 суток после вакцинации титр в сыворотке крови цыплят 1-й и 3-й групп составил $11,4 \pm 0,4 \log_2$ и $8,2 \pm 1,32 \log_2$ соответственно. Титр антител в сыворотках крови цыплят 2-й и 4-й групп через 14 суток после повторного введения вакцины составил $10,8 \pm 0,49 \log_2$ и $10,4 \pm 0,5 \log_2$. Данный показатель является высоким, и сравним с титром антител при однократной иммунизации. Можно сказать, что и однократная, и двукратная вакцинация является высокоэффективной, но в данном случае двукратное введение препарата нерационально.

Заключение.

Выбранный и используемый для изготовления инактивированной вакцины против гриппа птиц H5N2 масляный адъювант Montanide ISA-70 VG удобен в процессе производства. При соединении с антигеном образует достаточно стабильную

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.Нурiev, 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, Карпович В.К., младший научный сотрудник
Научный руководитель Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», 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