

© Елисеєва І. В., Бабич Є. М., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А., Балак О. К.

УДК 615.371:579.871.1:57.04:16-097

**Елисеєва І. В., Бабич Є. М., Ждамарова Л. А., Білозерський В. І., Колпак С. А., Балак О. К.**

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ДИФТЕРІЙНОГО БАКТЕРІЙНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТУ, ОДЕРЖАНОГО ЗА ДОПОМОГОЮ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЕННЯ НАДЗВИЧАЙНО ВИСОКОЇ ЧАСТОТИ, НА ФОРМУВАННЯ ГУМОРАЛЬНОГО АНТИТОКСИЧНОГО ІМУНІТЕТУ ТА КОЛОНІЗАЦІЙНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ В ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН**

**Державна Установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова  
НАМН України» (м. Харків)**

**altai89@rambler.ru**

Дана робота є фрагментом наукової теми «Дослідження імуногенності дифтерійного анатоксину сумісно з поверхневими антигенами *Corynebacterium diphtheriae* і методи подвійного контролю їх безпечності», № державної реєстрації 0114U000246.

**Вступ.** Уроки останнього епідемічного підйому захворюваності на дифтерію наприкінці 20-го сторіччя свідчать про актуальність для соціуму цієї небезпечної інфекції, незважаючи на існування широкого спектру специфічних профілактичних препаратів різних країн-виробників та високі показники охоплення населення профілактичними щепленнями [3, 4, 7, 11]. Встановлено, що епідемія дифтерії виникла та розвивалася в умовах високих показників протидифтерійного імунітету в населення й захворілих на дифтерію осіб, серед котрих більшу частину складали вакциновані згідно вимогам календаря щеплень [3, 4, 7]. Підґрунтям для розвитку епідемії цієї інфекції є передача збудника від осіб зі стертими, латентними формами захворювання та бактеріоносіїв. При цьому дослідження чутливості штамів *C. diphtheriae* до антибіотичних препаратів показали досить високий рівень переважання штамів, стійких до антибіотиків [6]. Отже основні епідеміологічні особливості останнього епідеміологічного підйому дифтерії ставлять питання про пошук шляхів впливу на обмеження та локалізацію циркуляції збудника серед населення.

В сучасній науковій літературі відновлюється обговорення необхідності створення вакцин, формуючих імунний захист проти адгезивної активності *Corynebacterium diphtheriae*, котрі попереджували б колонізацію збудником слизових оболонок дихальних шляхів. Такі вакцини мали б також сприяти вирішенню проблеми дифтерійного бактеріоносійства, котра не

може бути вирішена за допомогою існуючих засобів профілактичної імунізації, спрямованих на створення антитоксичного імунітету [2, 5, 13].

Результати останніх досліджень (Novartis Vaccines and Diagnostics) вказують на те, що вирішальну роль у розвитку набутого імунітету відіграє стимуляція механізмів природнього імунітету. Це призвело до того, що в поточний час багато зусиль докладається розробці підходів, котрі допомогли б задіяти механізми природнього імунітету у розвитку повноцінної імунної відповіді на вакцинацію [10].

З іншого боку, слід згадати, що в існуючих вакцинах проти дифтерії вже понад 90 років в якості ад'юванту застосовується алюміній. Сучасними дослідженнями експериментально доведено, що він є нейротоксином, і тому алюмінієві ад'юванти здатні викликати в людей серйозні імунологічні розлади. Зокрема, вони несуть у собі ризик аутоімунних захворювань, довгострокового запалення мозку та супутніх неврологічних ускладнень і різноманітних глибоких та несприятливих для здоров'я наслідків. Існує думка, що ризик потенційних побічних ефектів застосування алюмінію у вакцинах, очевидно, не одержав строгої наукової оцінки з боку медичної та наукової спільноти [12]. Тому саме пошук природного і безпечного для організму ад'юванта має стати перспективним шляхом удосконалення протидифтерійних вакцин.

В ході попередніх дослідів, за допомогою вузькосмугового електромагнітного випромінювання надзвичайно високої частоти (ЕМВ НЗВЧ), нами було одержано бактерійний дифтерійний антигенний препарат з підвищеним вмістом адгезинів. Показано, що вузькосмугове ЕМВ НЗВЧ призводить як до збільшення адгезивності тест-культури

*C. diphtheriae*, так і до накопичення адгезинів у рідкій фазі мікробної суспензії [2].

**Метою дослідження** стало вивчення ад'ювантних властивостей одержаних антигенних субстанцій *C. diphtheriae* з підвищеним вмістом адгезинів щодо формування антитоксичного дифтерійного імунітету, а також дослідження їх впливу на колонізаційну резистентність до інвазії патогенних коринебактерій при імунізації піддослідних тварин експериментальними вакцинними препаратами.

**Об'єкт і методи дослідження.** Об'єктом дослідження стала музейна культура *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+, № 255. Для виготовлення антигенних субстанцій з поверхневих антигенів збудників дифтерії використовували експериментальний генератор електромагнітного випромінювання надзвичайно високої частоти (ЕМВ НЗВЧ), наданий Інститутом радіофізики та електроніки НАНУ ім. О. Я. Усикова.

Одержання антигенних субстанцій включало наступні етапи: 1) накопичення мікробної маси; 2) підготовка мікробної суспензії *C. diphtheriae*; 3) опромінення дослідного зразку (СНд) вузькосмуговим ЕМВ НЗВЧ та екстракція поверхневих антигенів контрольного зразку *C. diphtheriae* (СНк) фізіологічним розчином; 4) центрифугування зразків, відокремлення супернатантів, визначення біохімічного складу та приготування експериментальних комбінованих кандидат-вакцин; 5) контроль стерильності одержаних препаратів.

Експериментальні комбіновані дифтерійні вакцини склалися з 0,5 мл досліджуваних антигенних препаратів у відповідних розведеннях та 1,0 мл (20 Лф/мл) очищеного дифтерійного анатоксину (АД), наданого ПАТ «Фармстандарт-Біолік»: (СНд+АД) та (СНк+АД).

В досліді були взяті 14 кролів середньою вагою близько 3,0 кг з виварію ДУ «ІМІ НАМН». Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Щеплення проводили підшкірно в дозі 1,5 мл експериментальної вакцини, дотримуючись правил асептики, у ділянці шкіри на боках, напередодні звільнені від шорстки.

Забір крові з вушних вен кролів для подальших серологічних досліджень проводили одноразовими шприцями об'ємом 1, 0-2,0 мл через 1, 2, 3 та 4 тижні після щеплення. Сироватки крові досліджували в РПГА з еритроцитарним дифтерійним антигенним діагностикумом рідким (виробництво ОАО «Біомед ім. І.І. Мечникова, серія 081014, придатний до 10.2015).

Для бактеріологічних досліджень на патогенні коринебактерії викорис-

товували кров'яно-телуристовий агар (КТА) та бульйон Лінгуда.

Адгезію *C. diphtheriae* досліджували відомим способом [1], але з доповненнями відповідно до суті експерименту, а саме: у сироватки крові імунізованих кролів додавали по 0,05 мл формалінованих нормальних еритроцитів барана, витримували 18 годин у холодильнику при температурі +8 °С, відбирали по 0,5 мл кожної сироватки та додавали до зависі формалінованих еритроцитів людини, витримували у термостаті при температурі +37°С півгодини, додавали по 0,5 мл 1 млрд. суспензії тест-штаму *C. diphtheriae*, знову витримували при температурі +37°С у термостаті півгодини, потім робили мазки та забарвлювали їх по Романовському-Гімза.

Сироватки крові кролів, щеплених експериментальними вакцинами, досліджували у реакції пасивної гемаглютинації. Середня геометрична величина титрів антитіл вираховувалася за формулою:

$$a_{cp.geom} = \sqrt[n]{a_1 \cdot a_2 \cdot \dots \cdot a_n} \quad (1)$$

**Результати досліджень та їх обговорення.** При вивченні ад'ювантної дії експериментальних антигенних субстанцій тваринам з контрольної групи вводили, відповідно, наступні препарати: 20 Лф очищеного дифтерійного анатоксину (АД), антигенний препарат, одержаний з опроміненої мікробної маси коринебактерій (СНд), антигенний препарат, одержаний з неопроміненої мікробної маси коринебактерій (СНк). Кролі з дослідної групи одержали однакову дозу дифтерійного анатоксину та різні дози бактерійних антигенних препаратів, відображені в таблиці 1 разом з результатами серологічних досліджень (табл. 1).

Одержані показники гуморального імунітету свідчать про ад'ювантну дію бактерійного антигенного

Таблиця 1

**Результати дослідження гуморального протидифтерійного імунітету в кролів, щеплених експериментальними комбінованими вакцинами**

№ пп	Склад вакцинного препарату	Титри РПГА по тижнях, (МО/мл)			
		1-й	2-й	3-й	4-й
1	СНд 1:10 (0,5 мл)+АД 20 Лф (1,0 мл)	0,125	0,06	0,5	0,5
2	СНд 1:40 (0,5 мл)+АД 20 Лф (1,0 мл)	2,0	1,0	1,0	2,0
3	СНк 1:10 (0,5 мл)+АД 20 Лф (1,0 мл)	2,0	2,0	1,0	1,0
4	СНк 1:40 (0,5 мл)+АД 20 Лф (1,0 мл)	0,03	0,03	4,0	4,0
5	СНк 1:20 (0,5 мл)+АД 20 Лф (1,0 мл)	0,125	0,125	1,0	0,25
Середня геометрична титрів		0,285	0,214	1,149	1,0
K1	АД 20 Лф (1,0 мл)+фіз. розчин (0,5 мл)	0,03	0,03	0,25	0,5
K2	СНд (0,5 мл)+фіз. розчин (1,0 мл)	0	0	0	0
K3	СНк (0,5 мл)+фіз. розчин (1,0 мл)	0	0	0	0

компоненту в експериментальних вакцинах (СН+АД) у порівнянні з моновакциною (АД). В кролів дослідної групи середня геометрична титрів антитіл перевищувала контрольні показники (К1), відповідно, у 9,5 разів на першому тижні, у 7,1 рази на другому тижні, у 4,6 рази на третьому тижні та у 2 рази на четвертому тижні спостереження. Максимальний рівень антитіл був зареєстрований на третьому тижні після щеплення – середня геометрична дорівнювала 1,149 МО/мл (табл. 1). У контролях К2 і К3, котрим вводився лише бактерійний антигенний компонент (СНд або СНк) результати РПГА були негативними.

Порівнюючи середні геометричні титри антитіл по групам «СНд» (№№ 1, 2) та «СНк» (№№ 3, 4) разом за чотири тижні, можна відзначити, що вони відрізнялися лише у 1,8 рази (1 розведення), тобто факт попереднього опромінення мікробної культури ЕМВ НЗВЧ в даному випадку не виявив принципової дії на підсилення ад'ювантною активності експериментального бактерійного антигенного препарату.

Дослідження впливу імунізації кролів експериментальними вакцинами з дифтерійним бактерійним антигеном на резистентність слизової оболонки носу до колонізації *C. diphtheriae* проводили на основі бактеріологічного стеження за динамікою елімінації мікробної культури тест-штаму при інтраназальному інфікуванні щеплених кролів.

Шестеро кролів розподілили на три групи по двоє тварин: першу імунізували комплексними експериментальними вакцинами, що містили 1,0 мл інактивованого бактерійного антигенного препарату, виготовленого з опроміненої ЕМВ НЗВЧ (СНд) культури *C. diphtheriae*, та 0,5 мл дифтерійного анатоксину в дозі 20 Лf; другій вводили по 1,0 мл СНд з додаванням 0,5 мл фізіологічного розчину замість дифтерійного анатоксину; контрольні тварини одержали очищений дифтерійний анатоксин в дозі 20 Лf 0,5 мл) у фізіологічному розчині (1,0 мл) (табл. 2).

На третьому тижні після імунізації у щеплених тварин взяли мазки з носових ходів для бактеріологічного посіву. Саме в цей час у щеплених кролів з першої групи, як і в тварин з попереднього дослідження, був зареєстрований найбільший в даному експерименті рівень антитоксичних антитіл – 0,25 та 1,0 МО/мл. Результати бактеріологічних досліджень показали, що в жодного кроля коринебактерії не висівалися, в усіх тварин на слизових оболонках носу переважала кокова мікрофлора.

На другий день після контролю мікрофлори тварин заражали шляхом введення у носові ходи кваців, змочених у мікробній суспензії *C. diphtheriae*, var. *gravis*, tox+, № 255. Надалі проводили щоденні бактеріологічні посіви зі слизових оболонок носу кролів на щільне та рідке поживне середовище на наявність *C. diphtheriae* (табл. 2). Виявилось, що після зараження в інфікованих тварин впродовж двох тижнів вдавалося виділяти типові грампозитивні палички, з кінцевими стовщеннями, розташовані парно у вигляді «V», «войлоку», тощо. В подальшому коринебактерії зникали з бактеріологічних посівів, і знову домінуючою ставала кокова мікрофлора. Як видно з даних, представлених у таблиці 2, в тварин, імунізованих лише дифтерійним анатоксином (АД), відсо-

ток позитивних результатів бактеріологічного посіву на коринебактерії був у 3,5 рази більший, чим в тварин, щеплених лише бактерійним антигеном, і в 21,2 раза більший, чим у кролів, щеплених комбінованою вакциною (СНд+АД).

З 28 виділених культур патогену на контрольну групу прийшовся 21 позитивний результат (75,0±8,2)%. При прямому посіві на щільне живильне середовище КТА всього виділено 15 культур – (53,6±5,1)%, в тому числі 12 з них (80,0±10,7)% – в тварин з контрольної групи. В дослідних кролів, котрі одержали щеплення комплексним експериментальним препаратом (СНд+АД), за двотижневий період коринебактерії з первинного посіву було виділено лише 1 раз.

Вивчення антиадгезивної активності сироваток крові щеплених кролів проводили через три тижні після імунізації при максимальних показниках гуморального імунітету. Результати обчислювали по наступним групам кролів: 1) тварини, що були щеплені дифтерійним бактерійним антигеном – (СНд+АД) або СНд; 2) контрольні тварини, котрим було введено АД (табл. 3).

Таблиця 2

**Результати бактеріологічних досліджень кролів, щеплених експериментальними бактерійними дифтерійними препаратами**

Уведені вакцинні препарати	Число досліджень	Кількість виділених культур коринебактерій	
		абс.ч.	(M±m), %
Бактерійний антиген (СНд)+АД	32	1	3,1±3,1
Бактерійний антиген (СНд)	32	6	18,8±6,9
Контроль (АД)	32	21	65,6±8,4
Всього	96	28	29,2±4,6

Таблиця 3

**Середні показники адгезії тест-штаму *C. diphtheriae* після додавання до суспензії еритроцитів сироваток крові щеплених експериментальними комбінованими вакцинами та контрольних тварин**

№ пп	Лабораторні тварини	СПА	КА	ІАМ
1	Щеплені	2,4±0,07	69,4±1,3	3,4±0,06
2	Контрольні	3,0±0,05	75,4±1,8	4,0±0,05

**Примітка:** 1) середній показник адгезії (СПА) – середня кількість мікробних клітин *C. diphtheriae*, які прикріпилися до одного еритроциту;

2) коефіцієнт адгезії (КА) – відсоток еритроцитів, що мали на своїй поверхні адгезовані коринебактерії;

3) індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) – відношення СПА до КА помножене на 100.

Вивчення адгезивних властивостей тест-штаму *C. diphtheriae* до формалінованих еритроцитів людини після їх експозиції із сироваткою піддослідних тварин, щеплених дифтерійним бактерійним антигеном, призвела до зменшення показників адгезії у порівнянні з контролем, відповідно: СПА – на 20, 0%, КА – на 8,0%, ІАМ – на 15%. Причому, різниця показників виявилася статистично достовірною: при  $P=95,5\%$   $t>2$  для усіх трьох показників. Це може вказувати на присутність у сироватці щеплених кролів протидифтерійних антиадгезивних антитіл, котрі блокували адгезини тест-штаму.

**Висновки.** Досліджувані дифтерійні бактеріальні антигени, введені до складу експериментальної дифтерійної вакцини у поєднанні з очищеним дифтерійним анатоксином, виявили ад'ювантну дію щодо формування антитоксичного протидифтерійного імунітету.

Імунізація дифтерійним бактеріальним антигеном запобігає колонізації слизових оболонок дослідних

тварин *C. diphtheriae*. Слід зауважити, що антиколонізаційна активність щеплення виявилася сильнішою у поєднанні бактерійного антигену з очищеним дифтерійним анатоксином.

Щеплення тварин досліджуваним бактерійним антигеном препаратом СНд, одержаним з модифікованих ЕМВ НЗВЧ мікробних клітин *C. diphtheriae*, було результативним щодо зниження адгезивних властивостей тест-штаму в дослідній системі *in vitro* «формаліновані еритроцити людини+сироватка крові щеплених кролів+мікробна суспензія *C. diphtheriae*», що має вказувати на присутність у сироватці антиадгезивних антитіл.

**Перспективи подальших досліджень.** Встановлені властивості одержаного дифтерійного бактерійного антигенного препарату є перспективними для використання його при конструюванні комплексної вакцини проти дифтерії з антитоксичною та антиколонізаційною дією.

### Література

1. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис, Т.А. Брилене, Х.П. Ленцнер [и др.] // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210-212.
2. Єлисеєва І.В. Адгезини коринебактерій як можливий компонент комплексної протидифтерійної вакцини / І.В. Єлисеєва, Є.М. Бабич, В.І. Білозерський [та ін.] // Тези докл. 4-й Міжнар. Наук.-практ. конф. «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології». – Харків, 16-17 жовтня 2014 року. – С. 116-117.
3. Козлов В.Г. Адьюванты в современной медицине и ветеринарии / В.Г. Козлов, С.В. Ожерелков, А.В. Санин [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2014. – № 1. – С. 91-102.
4. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии / Н.Н. Костюкова // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1999. – № 2. – С. 92-96.
5. Петрусевич Т.В. Причины заболеваний дифтерией привитых : автореф. дис. На соискание научной степени канд. мед. Наук : спец. 14.01.13 «Инфекционные болезни» / Т.В. Петрусевич. – Киев, 2004. – 33 с.
6. Харсеева Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизмов формирования / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 4. – С. 109-117.
7. Чагина И.А. Чувствительность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* к антибактериальным препаратам / И.А. Чагина, О.Ю. Борисова, В.Г. Мельников [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2014. – № 4. – С. 8-13.
8. Чудная Л.М. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии в Украине / Л.М. Чудная, В.Г. Окснюк, Л.С. Красюк [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. – № 1. – С. 10-12.
9. Cegelski L. The biology and future prospects of antivirulence therapies / L. Cegelski, G. R. Marshall, G. R. Eldridge [et al.] // Nat. Rev. Microbiol. – 2008. – Vol. 6 (1). – P. 17-27.
10. Cozens D. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections / D. Cozens, R. C. Read // Expert Rev. Anti Infect. Ther. – 2012. – Vol. 10 (12). – P. 1457-1468.
11. Jeffrey B. Ulmer. Vaccine manufacturing: challenges and solutions / Jeffrey B. Ulmer, Ulrich Valley, Rino Rappuoli // Nature Biotechnology. – 2006. – Vol. 24. – P. 1377-1383.
12. Mattos-Guaraldi A.L. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview / A.L. Mattos-Guaraldi, L.O. Moreira, P.V. Damasco [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2003. – Vol. 98. – P. 987-989.
13. Tomljenovic L. Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? / L. Tomljenovic, C.A. Shaw // Current Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 18. – P. 2630-2637.
14. Yelyseyeva I.V. Anti-adhesive Therapies as a Contemporary Means to Fight Infectious Diseases and Adherence Factors of *Corynebacteria diphtheriae* / I.V. Yelyseyeva, Ye.M. Babych, L.A. Zhdamarova [et al.] // Annals of Mechnikov Institute. – 2014. – № 2. – С. 7-19.

УДК 615.371:579.871.1:57.04:16-097

### **ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ДИФТЕРІЙНОГО БАКТЕРІЙНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТУ, ОДЕРЖАНОГО ЗА ДОПОМОГОЮ ЕЛЕКТРО-МАГНІТНОГО ВИПРОМІНЕННЯ НАДЗВИЧАЙНО ВИСОКОЇ ЧАСТОТИ, НА ФОРМУВАННЯ ГУМОРАЛЬНОГО АНТИТОКСИЧНОГО ІМУНІТЕТУ ТА КОЛОНІЗАЦІЙНУ РЕЗИСТЕНТНІСТЬ В ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН**

**Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Білозерський В.І., Колпак С.А., Балак О.К.**

**Резюме.** Робота присвячена пошуку шляхів удосконалення дифтерійної вакцини за рахунок введення до її складу бактерійних поверхневих антигенів *C. diphtheriae*. Встановлено, що одержаний антигенний препарат при імунізації піддослідних тварин проявив ад'ювантні властивості щодо очищеного дифтерійного анатоксину: в кролів дослідної групи кролів, щеплених комбінованою кандидат-вакциною, за даними РПГА, середня геометрична титрів антитіл перевищувала показники контрольної групи, щепленої дифтерійним анатоксином (АД),



відповідно, у 9,5 разів на першому тижні, у 7,1 рази на другому тижні, у 4,6 рази на третьому тижні та у 2 рази на четвертому тижні спостереження. При експериментальному зараженні в тварин, імунованих АД, відсоток позитивних результатів бактеріологічного посіву на коринебактерії був у 3,5 рази більший, чим в тварин, щеплених бактерійним антигеном, і в 21,2 рази більший, чим у кролів, щеплених комбінованою вакциною, що містила АД та бактерійний антиген. Вивчення адгезивних властивостей тест-штаму *C. diphtheriae* до формалінованих еритроцитів людини після їх експозиції із сироваткою піддослідних тварин, щеплених дифтерійним бактерійним антигеном, призвела до зменшення показників адгезії у порівнянні з контролем, відповідно: СПА – на 20,0%, КА – на 8,0%, ІАМ – на 15% ( $P=95,5\%$ ;  $t>2$ ). Вказані властивості одержаного антигенного препарату *C. diphtheriae* свідчать про перспективність його використання при конструюванні комплексної кандидат-вакцини проти дифтерії з антитоксичною та антиколонізаційною дією.

**Ключові слова:** *C. diphtheriae*, дифтерійні вакцини, бактерійний антиген, електромагнітне випромінювання надвисокої частоти, ад'юванти, антитоксичний імунітет, адгезія, колонізаційна резистентність

УДК 615.371:579.871.1:57.04:16-097

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДИФТЕРИЙНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА, ПОЛУЧЕННОГО ПРИ ПОМОЩИ ЭЛЕКТРО-МАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ, НА ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО АНТИТОКСИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА И КОЛОНИЗАЦИОННУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ У ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Елисеєва І.В., Бабич Е.М., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Колпак С.А., Балак А.К.**

**Резюме.** Работа посвящена поиску путей усовершенствования дифтерийной вакцины за счет введения в ее состав бактериальных поверхностных антигенов *C. diphtheriae*. Установлено, что полученный антигенный препарат при иммунизации подопытных животных проявил адъювантные свойства в отношении очищенного дифтерийного анатоксина: у кролей опытной группы, привитых комбинированной кандидат-вакциной, по данным РПГА, средняя геометрическая величина титров антител превышала показатели контрольной группы, привитой дифтерийным анатоксином (АД), соответственно, в 9,5 раз на первой неделе, в 7,1 раз на второй неделе, в 4,6 раз на третьей неделе и в 2 раза на четвертой неделе наблюдения. При экспериментальном заражении у животных, иммунизированных АД, процент положительных результатов бактериологического посева на коринебактерии был в 3,5 раза больше, чем у животных, привитых комбинированной комбинированной вакциной, содержащей АД и бактериальный антиген. Изучение адгезивных свойств тест-штамма *C. diphtheriae* к формализованным эритроцитам человека после их экспозиции с сывороткой подопытных животных, привитых дифтерийным бактериальным антигеном, привела к уменьшению показателей адгезии и в сравнении с контролем, соответственно: СПА – на 20,0%, КА – на 8,0%, ИАМ – на 15% ( $P=95,5\%$   $t>2$ ). Указанные свойства полученного антигенного препарата *C. diphtheriae* свидетельствуют о перспективности его использования при конструировании комплексной кандидат-вакцины против дифтерии с антитоксическим и антиколонизационным действием.

**Ключевые слова:** *C. diphtheriae*, дифтерийные вакцины, бактериальный антиген, электромагнитное излучение сверхвысокой частоты, адъюванты, антитоксический иммунитет, адгезия, колонизационная резистентность

UDC 615.371:579.871.1:57.04:16-097

**Study of Effects of Diphtheria Bacterial Antigenic Preparation Obtained by Means of Electromagnetic Radiation of Ultrahigh Frequency on the Formation of Humoral Antitoxic Immunity and Colonization Resistance in Experimental Animals**

**Yelyseyeva I.V., Babych Ye.M., Zhdamarova L.A., Belozersky V.I., Kolpak S.A., Balak A.K.**

**Abstract.** The lessons of the last epidemic getting up of morbidity at the end of 20th century testify to actuality for society of this dangerous infection without regard to existence of wide spectrum of specific prophylactic preparations and high indexes of scope of population prophylactic vaccination. As shown by many researchers from data of literature the epidemic of diphtheria arose up and developed in the conditions of high indexes of antitoxic immunity against diphtheria in a population. The greater part of patients with diphtheria was persons immunized according to the requirements of calendar of inoculations. A basis for development of epidemic of this infection is a transmission of causative agents from persons with the latent forms of disease and carriers. There is a high rate of strains with resistance to antibiotics among them.

Thus the basic epidemiology features of the last epidemiology getting up of diphtheria are set by a question about the search of ways of influence on limitation and localization of circulation of causative agent among a population.

The discussion of necessity of creation of vaccines forming immune defence against adhesive activity of Corynebacterium of diphtheriae recommences in modern scientific literature, that would prevent colonization of respiratory tracts mucous membranes by a causative agent. Such vaccines had also to assist the decision of problem of diphtherial carriers, that can not be decided by means of the existent facilities of prophylactic immunization directed to creation of antitoxic immunity. The perspective way of improvement of diphtheria vaccines would become search of natural and safe for the organism bacterial adjuvants as an alternative of hydroxide of aluminium.

The work is dedicated to finding ways to improve the diphtheria vaccine due to the introduction in its structure of bacterial surface antigens of *C. diphtheriae*. It was found that the obtained antigen preparation by immunization of experimental animals showed adjuvant properties in respect of purified diphtheria toxoid: rabbits in the exper-

imental group, vaccinated combined candidate-vaccine, according to the PHA, geometric middling antibody titers exceeded those that of the control group, inoculated with diphtheria toxoid (DT) respectively, 9.5 times the first week, 7.1 times in the second week, 4.6 times in the third week and 2 times in the fourth week of observation. In experimental infection in animals immunized with DT, the percentage of positive results of bacteriological inoculation of *Corynebacterium* was 3.5 times greater than in the animals vaccinated with the combination of the combined vaccine containing DT and bacterial antigen. Study of test-strain *C.diphtheriae* adhesive properties to formalinized human erythrocytes after exposure of them to serum of test animals immunized with diphtheria bacterial antigen, resulted in a decrease in adhesion rates compared with the control, respectively: Median Adhesion – 20.0%; Coefficient of Adhesion – by 8.0%; Microorganisms Adhesiveness Index – 15% ( $P=95.5\%$   $t>2$ ). These properties of the obtained antigen preparation *C.diphtheriae* indicate the prospects of its use in the design of complex candidate-vaccine against diphtheria with antitoxic and antikolonizatsion action.

**Keywords:** *C. diphtheriae*, diphtheria vaccines, bacterial antigen, electromagnetic radiation of ultrahigh frequency, adjuvants, antitoxic immunity, adhesion, colonization resistance.

*Рецензент – проф. Лобань Г.А.*

*Стаття надійшла 15.07.2015 р.*