

УДК 619:615.371:616.98:578.825.1:612.017

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АДЪЮВАНТОВ НА ФИЗИЧЕСКИЕ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ АУЕСКИ*Гусев А.А., Чаплыго К.Э.**РУП: «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого», г. Минск*

Как известно, инактивированные вакцины изначально обладают более низкой иммуногенной активностью, по сравнению с живыми. Это обуславливает необходимость применения адъювантов – веществ, неспецифически усиливающих иммунный ответ организма на введение антигена.

На сегодняшний день в ветеринарии при производстве инактивированных вакцин нашли применение следующие адъюванты: минеральные сорбенты в сочетании с сапонином для изготовления сорбированных вакцин и масляные адъюванты – для эмульсионных.

В качестве минеральных адъювантов используется гидрат окиси алюминия, фосфат алюминия, алюмо-калиевые квасцы и др.

Иммуногенность сорбированных препаратов находится в прямой зависимости от степени сорбции антигена. При этом качество процесса сорбции определяется многими факторами: соотношения антигена и сорбента, наличия балластных веществ белковой и небелковой природы, значения pH, температуры, времени сорбции и т. д.

Сорбированные препараты обладают недостатками: отсутствие стандартности по содержанию сухого остатка, недостаточная дисперсность, ускоренное расслоение при хранении, старение геля. Также, вакцины данного типа неспособны обеспечить выработку долгосрочного иммунитета, что влечет за собой необходимость проведения повторных иммунизаций. Добавление же к данным препаратам сапонины, который является мощным стимулятором иммуногенеза, также имеет отрицательные моменты. Так как, даже высокоочищенный сапонин (QS – 21) может оказывать токсическое действие на организм, связанное с его гемолитическими свойствами. Поэтому надо соблюдать точную дозировку сапонины (мг/кг) в прививочной дозе вакцины, которая не вызывала бы побочных эффектов.

Изготовление эмульсионных препаратов является результатом смешивания двух взаимно нерастворимых фаз: масляной и водной с применением поверхностно-активных веществ (ПАВ). При этом в зависимости от свойства ПАВ может быть получена эмульсия различных типов: «вода-масло» (обратная), «масло-вода» (прямая), «вода-масло-вода» (множественная) [1].

Для иммунизации сельскохозяйственных животных наиболее широко используют эмульсию обратного типа, для формирования долгосрочного иммунитета. Механизм действия данных эмульсий обусловлен их способностью формировать «депо» в месте инъекции, которое дает возможность постепенного и продолжительного высвобождения антигена, в результате чего происходит регулярное раздражение иммунной системы, которая реагирует постоянной выработкой специфических антител. Также иммуностимулирующее действие водно-масляной эмульсии формируется за счет активации неспецифических факторов иммунитета – макрофагов, которые захватывают частицы эмульгированного антигена и транспортируют их в органы иммунной системы, где формируются точки антителообразования [2].

С учетом этого, вакцинацию сельскохозяйственных животных целесообразней проводить с помощью эмульсионных вакцин.

Цель исследований – изучение влияния различных масляных адъювантов на физические и иммунобиологические свойства инактивированной эмульгированной вакцины против болезни Ауески.

Материалы и методы. Изготовление эмульсионных форм инактивированной вакцины против болезни Ауески (БА) проводили с применением готового масляного адъюванта фирмы Seppic под торговой маркой Montanide ISA-760 и смеси минерального масла Marcoll-52 с эмульгатами – безводный ланолин и №139.

Масляные адъюванты смешивали с инактивированным вирусом БА в соотношении эффективном для образования эмульсии обратного типа. Эмульгирование компонентов производили с помощью гомогенизатора IKA-T25 digital ULTRA TURRAX в течении 3-5 мин при скорости вращения винта 3-5 тыс. об./мин.

Определение типа эмульсии осуществляли «капельным» методом. Эмульсию относили к типу вода-масло, если она при помещении в воду формировала на ее поверхности каплю, с четко очерченными границами.

Стабильность эмульсии проверяли посредством центрифугирования при 3 тыс. об./мин в течение 30 минут. Эмульсию считали стабильной, если после центрифугирования в процессе визуального контроля не отмечалось никаких изменений ее внешнего вида.

Кинематическую вязкость измеряли с помощью капиллярного вискозиметра типа ВПЖ-2. Расчет производили по формуле: $V + C \cdot T$, где V – кинематическая вязкость, мм²/с; C – постоянная вискозиметра; T – средняя арифметическая времени истечения вакцины, с.

Реактогенность вакцины контролировали на белых мышах. Для этого группе мышей ($n=10$) массой 18-20 г. в одну из задних лапок подкожно в области стопы вводили образцы вакцины в объеме 0,05 мл. Через 10 дней после введения задние лапки обрезают по скакательный сустав и взвешивали. Индекс реактогенности рассчитывали по формуле:

$$P = (\sum M_o / \sum M_k - 1) \cdot 100 \%,$$

где $\sum M$ – сумма массы лапок опытной группы животных, $\sum M_o$ – сумма массы лапок контрольной группы животных.

Безвредность препарата определяли на белых мышах, массой 16-18 г, которым вводили подкожно 1 мл вакцины, с последующим наблюдением за клиническим состоянием животных в течение 10 суток.

Иммуногенность вакцины проверяли посредством иммунизации морских свинок вакциной в неразведенном виде и двукратными разведениями в плацебо. Через 21 сутки после вакцинации всех иммунизированных и контрольных животных заражали эпизоотическим штаммом вируса БА в дозе 10 ЛД₅₀/мл. Оценку иммуногенности проводили по величине минимальной дозы вакцины, обеспечивающей 50%-ный защитный эффект (ИмД₅₀/мл).

Антигенность вакцины определяли по уровню образования специфических антител в сыворотке крови вакцинированных животных. С этой целью за сутки до контрольного заражения у всех животных отбирали пробы крови для исследования их сывороток в реакции нейтрализации (РН) по общепринятой методике.

Результаты исследования. При изготовлении образцов эмульсионной вакцины против БА, соотношение масляной и водной фаз устанавливали опытным путем, оценивая тип образования эмульсии, ее устойчивость и вязкость.

Физические характеристики образцов вакцины представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Физические характеристики образцов вакцины, приготовленных с применением различных адъювантов

№	адъювант	свойства		
		тип	вязкость, мм ² /см	устойчивость
1.	ISA - 760	вода-масло	39,3	+
2.	Marcoll-52 + №139	вода-масло	74,52	+
3.	Marcoll-52 + безводный ланолин	вода-масло	416,8	+

Как видно из таблицы 1, оптимальными физическими свойствами обладала эмульсия, приготовленная на основе масляного адъюванта ISA-760. Данный образец отличался стабильностью и наличием низкой вязкости. При этом оптимальное соотношение адъюванта к водной фазе составило 60-70:30-40.

Адъюванты, состоящих на основе минерального масла с эмульгаторами №139 и ланолин, также формировали стабильную эмульсию при соотношении компонентов 60-70:30-40. При этом массовая доля эмульгатора №139 к Marcoll-52 составила – 5%, ланолина – 15%. Уменьшение количества эмульгатора в адъюванте приводило к формированию нестабильной эмульсии. Образец, в состав которого входил ланолин, обладал высокой кинематической вязкостью, показатели которой увеличивались при температуре 4-6°C.

Реактогенность образцов вакцины определяли в опытах на белых мышах. Исходя из полученных величин процента отека лапки, вакцину расценивали, как слабо реактогенной, если индекс не превышал 24%, умеренно реактогенной, если индекс составлял 25-50%, выражено реактогенный, при значении индекса 50-100%.

Результаты исследований вакцины на реактогенность приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Реактогенность вакцины в зависимости от используемого адъюванта

№	адъювант	средний вес лапок, г		индекс реактогенности, %
		опыт	контроль	
1.	ISA- 760	0,1454	0,1073	35,5
2.	Marcoll-52 + №139	0,1795	0,1092	64,4
3.	Marcoll-52 + безводный ланолин	0,1967	0,1085	81,3

Из данных таблицы 2 видно, что образцы вакцины №2 (Marcoll-52 + №139) и №3 (Marcoll-52 + безводный ланолин) обладали выраженной реактогенностью (64,4 и 81,3%), а образец №1 (ISA-760), являлся умеренно реактогенным препаратом (35,5%). Исходя из полученных данных, для дальнейших исследований использовали адъювант ISA- 760.

При оценке безвредности вакцины на белых мышах, препарат оказался безвредным, т.к. все опытные животные остались живы и клинически здоровы, в течение всего срока наблюдения.

Иммуногенность вакцины определяли посредством контрольного заражения вакцинированных животных. Было установлено, что однократная подкожная иммунизация морских свинок вакциной на основе адъюванта ISA-760 обеспечивает их защиту от контрольного заражения эпизоотическим штаммом в дозе 10 ЛД 50/мл. Иммунизирующая доза вакцины для морских свинок составила 0,1 мл. Защитный титр антител в РН при этом имел значение 1:16.

Выводы.

1. Использование масляного адъюванта ISA-760 в составе инактивированной эмульгированной вакцины против БА позволяет получить эмульсию типа вода в масле, обладающей высокой стабильностью и низкой кинематической вязкостью.

2. Инактивированная эмульгированная вакцина против БА на основе адъюванта ISA-760 безвредна и индуцирует у однократнопривитых животных образование напряженного иммунитета к данной инфекции.

Список литературы

1. Медуницын, Н.В. Вакцинология/Н.В.Медуницын. Москва: Триада, 1999. – 324с. 2. Ройт, А. Иммунология. Пер. с англ./А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. Москва: Мир, 2000. – 592 с.

INFLUENCE VARIOUS ADJUVANTS ON PHYSICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF THE INACTIVATED VACCINE AGAINST AUJESZKY'S DISEASE

Gusev A.A., Chaplyho K. E.

RUP "Institute of Experimental Veterinary Science named after S.N. Vyshel'sky", Minsk, Belarus

In article, the results of designing of the inactivated vaccine against Aujeszky's disease with application of various adjuvants are shown. Influence of adjuvants on physical and immunobiological properties of the vaccine is studied.