

Як видно з рис. 2, після ін'єкційного введення нативного вакцинного препарату середній титр антитіл у вакцинованих тварин складав (1:640). При цьому пероральне використання нативного корпускулярного антигену не викликало індукції синтезу специфічних антитіл.

Хімічно модифікований антиген на 1 % від концентрації в ньому білку індукував такий же рівень антитіл, як і нативний антиген (1:640). Модифікація поверхневих антигенів на 3 % приводила до індукції антитіл на рівні (1:320) для перорального варіанту та на рівні (1:2560) – для ін'єкційного.

Для похідних антигенів з іншими ступенями ацилювання при їх пероральному використанні не спостерігалось індукції синтезу специфічних антисиньогнійних антитіл. При цьому, ін'єкційний варіант був ефективним навіть з похідним з 15 % ступенем ацилювання: похідне з 5 % ступенем ацилювання індукувало синтез антитіл на рівні (1:1280), похідне із 7 % ступенем ацилювання – на рівні (1:320), похідне із 9 % – на рівні (1:40), інші варіанти (із 11 % та 15 % ступенем модифікації) – на рівні (1:20).

**Висновки.** Доведено, що часткове ацилювання суттєво підвищує гідрофільність молекули білку та її заряд, що, на наш погляд, надає змогу імуніцитам більш чітко та широко розпізнавати епітопні фрагменти в структурі ацилполісахариду, аніж у нативному антигені.

Найбільш ефективним виявилось похідне із ступенем ацилювання 3 %, яке індукувало синтез специфічних антитіл як при ін'єкційному, так і при пероральному застосуванні.

#### Список літератури

1. Мартинов, А.В. Новый напрямок у розробці ліків – хімічна модифікація генно-інженерних білкових ліків та вакцинних антигенів [Текст] / А.В. Мартинов, Н.П. Волянська // Укр. журн. клініч. та лаб. медицини. – 2008. – Т. 3, № 4. – С. 100–103.
2. Diaz-Romero, J. Coexpression of CD4 and CD8alpha on rat T-cells in whole blood: a sensitive marker for monitoring T-cell immunosuppressive drugs [Text] / J. Diaz-Romero, G. Vogt, G. Weckbecker // J. Immunol. Methods. – 2001. – Vol. 1, № 254 (1-2). – P. 1–12.
3. Ballmer, K. Modulation of EGF binding and action by succinylated concanavalin A in fibroblast cell cultures [Text] / K. Ballmer, M.M. Burger // J. Supramol. Struct. – 1980. – Vol. 14, № 2. – P. 209–214.
4. Hancock, R.E.W. Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins [Text] / R.E.W. Hancock, A.M. Carey // J. Bacteriol. – 1979. – Vol. 44, № 140. – P. 902–910.
5. Белковые компоненты питательных сред и их антигенные свойства [Текст] / А.А. Шинкаренко [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1976. – № 4. – С. 100–103.
6. Некоторые физико-химические характеристики анатоксина синегнойной палочки [Текст] / А.А. Шинкаренко [и др.] // Микроб. журн. – 1986. – Т. 48, № 6. – С. 29–31.
7. *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4 [Text] / R.K. Ernst [at al.] // J. Endotoxin Res. – 2003. – Vol. 9, № 6. – P. 395–400.

### PERSPECTIVE OF THE VACCINE PREPARATIONS DEVELOPMENTS BASED ON ATSYLOVANYH IMMUNOGENIC DERIVATIVES BIOPOLYMERS P.AERUGINOSA

Volanska N.P.

SE «Institute of microbiology and immunology the name of I.I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

*On the basis of surface antigens P. aeruginosa 66-16 by acylation returned substance has high glycoproteides. In this experiment the immunogenicity of antigens 48 samples of different degree of acylation were investigated, 12 of them were selected for constructing anti-pseudomonas vaccines. As carriers of antigens used liposomes of 50 nm m.m.900 Da. The degree of accumulation lecithin's liposomes in the cells of reticulo-endothelial system of animals. The vaccine was stabilized by ascorbate Na, protected by conservant – benzoate Na. A two dosage forms of vaccine – for transdermal and oral delivery were created. The stability and sensitizing properties of the vaccine preparation were studied. Normative and technical documentation, specifications and project pharmacopoeial article for two dosage forms vaccine (transdermal and oral) were developed.*

УДК 579.880+57.082.544

### ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ І КОНСТРУЮВАННЯ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ НОВИХ ПОКОЛІНЬ ДЛЯ ГУМАННОЇ ТА ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

Волянський А.Ю.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків

Розробка вакцин майбутнього проводиться в кількох напрямках: створення генноінженерних вакцин, синтетичних пептидних препаратів, ДНК-вакцин, антиідіотипових вакцин, рослинних та мукозальних (ентеральних) препаратів тощо.

Науковці ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України» (м. Харків) розробляють вакцин найближчого майбутнього – ентеральних форм імунобіологічних препаратів.

Часом і фактами підтверджено, що масові щеплення призводять до значного зниження захворюваності на дифтерію та кашлюк. Проте навіть ретельна, з використанням надійних препаратів, планова вакцинація не завжди забезпечує достатньо тривалий специфічний імунітет. За літературними даними в США, Франції, Данії та багатьох інших країнах спостерігається швидке та суттєве зниження кількості антитіл у крові вже через рік після первинної імунізації у 10 % щеплених дітей, через 3 роки – майже у 70 % щепленого контингенту. На наш погляд, вказане пов'язано, також і з зменшенням частоти природного контакту людей зі збудниками дифтерії та кашлюку, обумовленої циркуляцією патогенних бактерій в популяції, що негативно позначається на інтенсивності ревакцинації [1].

Відтворення процесів природного антигенного стимулу частково можна досягти за допомогою організації періодичних масових додаткових щеплень малими дозами вакцини. Проведення такої «бустер-імунізації» дитячого населення можливе лише за наявності профілактичних препаратів з оптимізованим (полегшеним, спрощеним) шляхом їх введення. Мова йде про пероральні форми вакцин.

Однією з недостатньо вирішених проблем при зазначених інфекціях являється також імунологічна толерантність. Вирішення її в значній мірі може бути пов'язане із застосуванням препаратів з різкими антигенними властивостями, **підвищуючих** чутливість дітей та дорослих до імунобіологічних засобів.

Розробка пероральних вакцин дозволить забезпечити безперервність антигенного стимулу, що прямує опосередковано (але постійно) буде підтримувати на достатньо високому рівні колективний імунітет щодо інфекцій, керованих засобами специфічної

профілактики. До того ж такий спосіб імунізації є найпростішим, фізіологічно адекватним і психологічно привабливим. Дослідники, які працюють над розробкою пероральних вакцин, відзначають їх низьку реактогенність, слабку алергенність, простоту методу введення при високій імунологічній ефективності [2, 3].

На сьогоднішній день парентеральний спосіб вакцинації широко застосовується при щепленні населення проти поліомієліту, запропоновано також препарати проти туберкульозу, чуми, венесуельського енцефаліту коней [4–8]. Науково обґрунтовано і експериментально доведено передумови розробки пероральних вакцин проти туляремії, бруцельозу, Ку-лихоманки, грипу, епідемічного паротиту, кіру, стафілококової інфекції тощо [3].

Проводяться дослідження по створенню таких препаратів проти кашлюку, дифтерії, менінгокової інфекції [9–10]. У стадії розробки технології одержання парентеральних ДНК-вакцин проти СНІДу, що може стати переломним моментом у боротьбі з ВІЧ-інфекцією у всьому світі.

Переважаюча більшість наукових розробок направлена на одержання вакцинних препаратів з типових збудників інфекційних захворювань. Дослідження, що проводяться в інституті, націлені на одержання антигенів, які зустрічаються у інфікованих осіб при персистенції збудників на тлі специфічного імунітету, а також широкого застосування антибіотиків. Такі антигенні комплекси відображають біологічні зміни бактерій, які широко відбуваються під впливом негативних факторів, в першу чергу антибіотиків. Застосування їх для розробки вакцинних препаратів відкриває перспективу діяти проти збудника на випередження, пов'язане з мінливістю бактерій, зокрема утворенням L-форм.

Згідно з даними літератури L-форми бактерій та некультивуємі варіанти патогенів відіграють важливу роль в розвитку хронічних захворювань, а також сприяють виникненню онкологічних процесів.

У роботах приведені вагомні статистично аргументовані результати, які підтверджують етіологічну роль L-форм стрептококів та збудників бруцельозу у виникненні хронічної патології вказаними агентами [11–13].

Встановлено, що L-форми мікроаерофільних бактерій (*H. pylori*) збільшують ризик розвитку карциноми шлунку [14], а позбавлені стінок сальмонели мишачого тифу суттєво посилюють дію ендотоксину даного збудника, що приводить до тяжкого перебігу таких захворювань [15].

L-форми бактерій відзначаються високою стійкістю до антибіотиків. Тому формування таких варіантів збудника негативно позначається на ефективності лікування хворих. Особливо це проявляється при туберкульозній патології, відносно якої протимікробний арсенал дуже обмежений [16].

В окремих роботах показано, що застосування вакцин з L-форм бактерій захищає від негативної дії повноцінних по наявності клітинної стінки патогенних бактерій і попереджає розвиток хронічних захворювань [17].

У літературі відзначається, що технологія одержання L-форм бактерій досить складна та являється головною перепороною у створенні профілактичних препаратів на їх основі [18].

Ще менш вивчені некультивуємі форми патогенних бактерій. Основні висновки наукових робіт зводяться до того, що такі варіанти мікробів слід розглядати як успадковано закріплений неактивний стан бактеріальних клітин, який притаманний для популяцій внаслідок впливу стресових факторів, у т.ч. дії етіотропної терапії [15].

Дослідження в інституті проводили в трьох напрямках: розробка ентеральних зразків на основі мікробних клітин, поверхневих антигенів, анатоксину збудників дифтерії та кашлюку. Встановлено, що пероральне введення мікробних клітин та їх стін очних структур у якості ревакцинуючого щеплення досить перспективне і може мати практичний вихід недалекого майбутнього. Експериментально відпрацьовані комбіновані схеми дозволять зменшити пероральні дози зразків у 2–3 рази порівняно із загальноновизнаними схемами, в яких ін'єкційна ревакцинація замінена ентеральною.

Зазначене свідчить, що удосконалення схем введення антигенів може дати позитивний ефект тільки в обмежених рамках. Незважаючи на досягнуте зменшення вакцинуючи доз, антигенне навантаження при пероральному щепленні залишається досить високим.

У подальшому для того, щоб підвищити імуногенність ентеральних зразків, проведено вивчення впливу різних модифікаторів на антигенні властивості мікробних клітин та їх поверхневих структур. Дослідження показали, що за допомогою окремих модифікаторів можна досягти значного підвищення (у 10–100 разів) гуморального імунітету у експериментальних тварин. Проте цей напрямок роботи потребує подальшого розвитку. Успішна модифікація можлива поки що тільки відносно антигенів простої хімічної структури і, що саме важливе, в умовах застосування антигенів з точними параметрами хімічної структури. Вказане потребує удосконалення методів одержання антигенів заданої хімічної природи. Дослідження будуть розвиватися в напрямку розробки фізичних та хіміко-фізичних технологій із застосуванням ферментів та молекулярних сит.

Підвищення імуногенних властивостей пероральних вакцин-кандидатів пов'язано також з розробкою та застосуванням мікробних ад'ювантів із числа дифтероїдів. Проводиться пошук малоруїнівних методів виділення нативних поверхневих антигенів та скринінгові дослідження впливу їх на формування напруженого гуморального імунітету проти вакцинних препаратів. Виділені перспективні в якості ад'ювантів мікробні сполуки з направленою без пошкоджуючи ефектів фагостимулюючою дією.

Проводиться вивчення перспективності одержання парентеральних та ентеральних вакцин-кандидатів проти L-форм збудників дифтерії та кашлюку. Робота виконана в межах відтворення та удосконалення окремих методів звільнення повноцінних по морфології мікробних клітин від стін очних структур і визначена їх пригнічуюча роль при формуванні гуморального імунітету проти окремих вакцинних препаратів.

Зазначені напрямки досліджень не можливо успішно розвивати без достатнього матеріального забезпечення. Саме залишкове фінансування тем, яке не дозволяє закупати в достатній кількості живильні середовища, реактиви, лабораторних тварин, а також необхідне обладнання (хроматограф, денситометр з електрофоретичною камерою, високошвидкісні центрифуги, спектрофотометр, анаеростат-термостат, вакуумні сушильні шафи, CO<sub>2</sub>-інкубатор, ліофільна сушка, сучасні дослідницькі мікроскопи високого класу та ін.) являється головною причиною вкрай уповільненого вирішення поставлених у роботі наукових питань. Це підвищує вартість наукових досліджень, оскільки спричиняє значне збільшення строків виконання запланованих НДР.

### Список літератури

1. Научные исследования и разработки в области вакцин [Текст] : материалы 87-й Сессии исполнительного комитета Всемирной организации здравоохранения 21 ноября 1990 г. – 11 с. 2. Vorobjev, A.A. Non-invasive vaccination. Abstracts Intern. Cont. on Modern Vaccinology [Text] /

A.A. Vorobjev. – Ufa, Russia, 1996. – 30 p. 3. Воробьев, А.А. Непарентеральные вакцины: принципы конструирования и эффективность [Текст] / А.А. Воробьев // ЖМЭИ. – 1998. – № 1. – С. 97–100. 4. Чумаков, М.П. [и др.] // Материалы 4 сессии Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов. – М., 1961. – С. 12–26. 5. Медуницын, Н.В. Вакцинология [Текст] / Н.В. Медуницын. – М. : Триада-Х, 1999. – 272 с. 6. Immunogenicity of a recombinant strain of vaccinia virus, expressing a Venezuelan equine encephalomyelitis virus structural protein gene in peroral immunization [Text] / V.A. Sviatchenko [at al.] // Vopr. Virusol. – 2000. – Vol. 45, № 6. – P. 38–41. 7. Воробьев, А.А. Микробиология и иммунология [Текст] / А.А. Воробьев. – М. : Медицина, 1999. – 464 с. 8. Воробьев, А.А. Современные направления в разработке новых иммунобиологических препаратов [Текст] / А.А. Воробьев // ЖМЭИ. – 1999. – № 5. – С. 16–21. 9. Adjuvanticity of pGPL-M and LRS in the immune responses of monkeys to oral immunization with diphtheria and tetanus toxoids [Text] / H. Mirchamsy [at al.] // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 1997. – Vol. 20(1). – P. 13–20. 10. Antibody responses in the serum and respiratory tract of mice following oral vaccination with liposomes coated with filamentous hemagglutinin and pertussis toxoid [Text] / C.A. Guzman [at al.] // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61, № 2. – P. 573–579. 11. Atypical behaviour and survival of *Streptococcus pyogenes* L forms during intraperitoneal infection in rats [Text] / L. Michailova [at al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 28(1). – P. 55–65. 12. The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin binding proteins (PBPs) in pathogenicity [Text] / M. Banai [at al.] // Vet. Microbiol. – 2002. – Vol. 90, № 1–4. – P. 263–279. 13. Guan, J. Retrospective study on the risk factors in patients with nosocomial bacterial L-form infection [Text] / J.Guan, Y.Sun, D. Zhu // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. – 1998. – №19(6). – P. 339–342. 14. Relation between *helicobacter pylori* L-form infection and tumor angiogenesis in human esophageal carcinoma [Text] / D.H. Yu [at al.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2003. – №25 (1). – P. 51–54. 15. Induction of hypersensitivity to endotoxin in C3H/HeJ mice by immunization with L-form *Salmonella typhimurium* [Text] / A. Nakano [at al.] // Immunol. Lett. – 1993. – Vol. 39, № 1. – P. 77–82. 16. Wang, H. Observations of properties of the L-form of *M. tuberculosis* induced by the antituberculosis drugs [Text] / H.Wang, Z. Chen // Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. – 2001. – № 24(1). – P. 52–55. 17. Conversion of *Salmonella typhimurium* to L-forms contributes to the maintenance of acquired immunity against murine typhoid [Text] / E. Kita [at al.] // Immunology. – 1995. – Vol. 86. – № 2. – P. 206–211. 18. Innes, C.M. Induction, growth and antibiotic production of *Streptomyces viridifaciens* L-form bacteria [Text] / C.M. Innes, E.J. Allan // J. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 90, № 3. – P. 301–308.

## ASPECTS OF THE DEVELOPMENT AND CONSTRUCTION THE NEW GENERATIONS VACCINE PREPARATIONS FOR HUMANE AND VETERINARY MEDICINE

Volyanskiy A.Yu.

SE «Institute of Microbiology and Immunology the name of I.I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

Were presents the methodological and methodical approaches to the development and design of new generations of vaccine preparations for human and veterinary medicine. The author determined the prospect of immunological products using chemical and biological modifiers.

УДК 619:579.842.14:57.083.33

## ВИБІР СПОСОБУ ОЧИЩЕННЯ АНТИГЕНУ БАКТЕРІЇ *SALMONELLA ENTERITIDIS* ДЛЯ НЕПРЯМОГО ВАРІАНТУ ІФА

Драгуть С.С., Стегній Б.Т.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Сальмонельоз – зооантропонозне захворювання, яке викликають бактерії роду *Salmonella*, має велике епідеміологічне значення як чинник харчових токсикоінфекцій у людей та відіграє значну епізоотологічну роль, спричиняючи у тварин, птиці моно- або асоціативні інфекції з різним клінічним проявом. Основним резервуаром збудника сальмонельозу є птиця, зокрема кури. Провідна роль в етіології сальмонельозу курей понад 25 останніх років належить серовару *Salmonella Enteritidis*.

У більшості розвинутих країн розробляються програми заходів, спрямовані насамперед на профілактику сальмонельозів, які включають обов'язкове проведення моніторингових досліджень щодо сальмонельозу птиці. Для цього МЕБ рекомендує використовувати серологічні тести [1]. Оптимальним методом для серологічного моніторингу є високочутливий та специфічний метод ІФА, який дозволяє піддавати дослідженню велику кількість зразків сироваток крові впродовж робочого часу [2].

Відомо, що ліпополісахаридний антиген є найбільш специфічним компонентом бактеріальної клітини та його активність і специфічність залежать від способу одержання [3].

Тому метою нашої роботи був підбір способу виготовлення очищеного антигену, зокрема цієї фракції бактерії *Salmonella Enteritidis* (SE) для непрямого варіанту ІФА.

**Матеріали та методи досліджень.** У роботі був використаний виробничий штам *M. Salmonella Enteritidis*, який зберігається в депозитарії ДНКІБШМ.

Бактерії вирощували на МПА за температури 37 °С. Змиви добових культур сальмонел з агару робили стерильним 0,85 % фізіологічним розчином. Клітини бактерій відмивали центрифугуванням за 3000 об/хв протягом 30 хвилин. Супернатант видалляли, а клітини осаду ресуспендували до концентрації 20 млрд. МК/см<sup>3</sup> за стандартом мутності. Бактеріальну суспензію прогрівали на водяній бані до температури 65 °С, додавали рівний об'єм 90 % фенолу і з постійним перемішуванням суміш інкубували за цієї температури впродовж 5 хвилин. Виготовлену рідину охолоджували до 0 °С та витримували в цьому режимі 30 хвилин. Після центрифугування охолодженої суспензії за 4000 г протягом 40 хв верхній шар обережно відбирали піпеткою й діалізували проти 100 об'ємів дистильованої води протягом 48 годин. Отриманий матеріал (II) порівнювали з матеріалом (I), який включав етапи культивування сальмонел в МПБ (за температури 37 °С); інактивації добової культури (1 % формаліном протягом доби за температури 37 °С); обробку детергентом ДСН у співвідношенні 1 мг/мг білка та діаліз проти ФБР, рН (7,3±0,1) з додаванням 0,01 % ЕДТА впродовж 48 годин за температури 4 °С.

**Активність** отриманих зразків антигенів з гомологічною сироваткою визначали у твердофазному ІФА. Для сенсibiliзації планшетів (96-лункових для імунологічних досліджень виробництва «Нупс», Данія) на КББ (рН 9,6) робили розведення антигенів від 1:100 до 1:1000 і вносили по 0,1 см<sup>3</sup> у лунки. Планшети з імобілізованим антигеном інкубували протягом 16–18 годин за температури 4 °С. В якості блокуючого розчину використовували 1 % БСА (бичачий сироватковий альбумін).

Сальмонельозні сироватки від імунованих курей (35 зразків), які надійшли з сектору мікоплазмозів і сальмонельозів, а також нормальну сироватку від інтактних курей розтитрували двократно з початкового їх розведення 1:100. Як детекторні антитіла був використаний антивидовий імунопероксидазний кон'югат проти IgG курей (НДІЕМ ім. Н.Ф. Гамалеї). Субстрат – ОФД (ортофенілендіамін); стоп-реактив – 1 М сірчана кислота. Облік реакції здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Magellan» та рідера «Sunrise» при λ=492 нм. Титром сироватки вважали останнє її розведення, в якому середнє значення оптичної щільності не менше, ніж у два рази перевищувало цей показник негативної сироватки, тобто за S/P-співвідношенням, не меншим за 2.

Контроль специфічності ЛПС-АГ проводили щодо відсутності позитивної реакції ІФА (з використанням аналогічного антиколюючого кон'югату) з гетерологічними сироватками кролів, що містять антитіла до грампозитивної *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, грамнегативної спільнородинової (*Enterobacteriaceae*) *Escherichia Coli*, а також видової, зі спільним з SE соматичним антигеном (1; 9) однієї серогрупи *D. Salmonella Pullorum-Gallinarum*.