

## ПРИМЕНЕНИЕ МУКОЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ С АДЬЮВАНТОМ ЭМУЛЬСИГЕН®-D

Волкова М.А., Чвала И.А., Ирза А.В., Долгов Д.Л.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Российская Федерация

Капчинский Д.Р.

ARS SERPL, США

Мукозальные вакцины, главными компонентами которых являются специфический антиген и природные или синтетические вещества, обладающие мукоадгезивной активностью, вводимые интраназально или перорально, представляют одно из перспективных направлений в современной вакцинопрофилактике. Применение мукозальных вакцин обеспечивает формирование более широкого спектра иммунного ответа по сравнению с вакцинами, вводимыми парентеральным способом [3, 4]. Основную роль в определении длительности и силы иммунного ответа на вакцинацию играет антиген, а именно, доза, кратность и способы его введения. Для выработки продолжительного иммунного ответа часто требуется многократное введение вакцинных препаратов. Необходимость бустерной вакцинации может объясняться тем, что для индукции детектируемого уровня антител нужно увеличить дозу вводимого антигена. В целях безопасности это достигается введением дополнительной прививки, а не за счёт увеличения дозы антигена при однократном введении. Коммерческий препарат эмульсиген®-D, который является адьювантом и иммуномодулятором, и успешно зарекомендовал себя в ветеринарной практике для внутримышечного и подкожного применения совместно с бактериальными и вирусными антигенами [6] был испытан нами ранее для мукозального применения [2]. Трёхкратное местное введение вакцины против НБ с эмульсиген®-D индуцировало у цыплят недостаточно продолжительный специфический иммунный ответ. С целью усиления специфического иммунного ответа и увеличения продолжительности иммунитета было решено использовать дополнительную прививку.

**Целью** наших исследований являлось изучение иммунного ответа цыплят после применения экспериментальной инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни (НБ), содержащей адьювант эмульсиген®-D, при 4-х кратном интраназально-интраокулярном введении.

**Материалы и методы.** *Вакцины.* В качестве специфического антигена использовали инактивированный и концентрированный ультрацентрифугированием вирус НБ, штамм «Ла Сота», полученный культивированием в 9–11-суточных эмбрионах СПФ-кур (АГ ВНБ). Активность антигена в реакции *гемагглютинации* (РГА) составляла не менее  $13 \log_2$ . Было изготовлено 2 вакцинных препарата. Первый препарат готовили простым смешиванием антигена ВНБ с коммерческим адьювантом эмульсиген®-D фирмы MVP Laboratories Inc Corp., США, второй препарат – смешиванием АГ ВНБ и фосфат-буферного раствора (ФБР). Титр антигена ВНБ в готовых вакцинных препаратах составлял  $1:1024$  в Б-ИФА.

*Эксперимент на животных.* Для проведения эксперимента были сформированы 3 группы 21-суточных коммерческих цыплят яичного направления по 10 голов в каждой: цыплят первой группы иммунизировали вакциной с адьювантом интраназально-интраокулярно трёхкратно с интервалом 5 суток в объёме 0,2 мл, цыплят второй группы аналогично вакцинировали инактивированным ВНБ с ФБР, цыплята 3 группы (отрицательный контроль) оставались не привитыми. Через 21 сутки после третьей прививки цыплята были ревакцинированы интраназально-интраокулярно в такой же дозе.

*Непрямой вариант ИФА.* ИФА для определения титра антител в сыворотках крови, слёзной жидкости и трахеальных смывах цыплят проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями [1]. Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

*Реакция торможения гемагглютинации (РТГА).* РТГА проводили с использованием коммерческого набора для выявления антител к вирусу НБ в РТГА (ФГБУ «ВНИИЗЖ») согласно инструкции по применению.

*Количественный анализ субпопуляций лимфоцитов.* Выделение лимфоцитов из периферической крови кур проводили по стандартной методике с использованием Ficoll-Paque<sup>™</sup> PLUS (Amersham Biosciences, Швеция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченых моноклональных антител CD3-FITC, CD4-PE и CD8 $\alpha$ -FITC (Southern Biotech, США). Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

*Статистический анализ результатов.* Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 6.0. Существенность различий результатов серологических исследований проб от цыплят из вакцинированных и контрольной групп определяли с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследований.** В соответствии с поставленной задачей определяли параметры иммунного ответа цыплят после 4-кратной вакцинации против ньюкаслской болезни в течение 8 недель после последней иммунизации. Эффективность вакцин определяли на 21-суточных цыплятах, не вакцинированных против ньюкаслской болезни. Для определения активности мукозальных вакцинных препаратов исследовали три вида проб биологического материала: кровь, трахеальные смывы и слезную жидкость с использованием двух серологических тестов (РТГА и ИФА).

Результаты исследования сывороток крови, отобранных у цыплят после 3-й вакцинации и еженедельно в течение 8 недель после 4-й вакцинации (с 38 по 115 сутки жизни), в РТГА представлены в таблице.

**Таблица – Результаты выявления антител к вирусу НБ в сыворотках крови кур в РТГА**

№ группы	Недели после 3-й вакцинации / титры антител в РТГА ( $\log_2$ )		Недели после 4-й вакцинации / титры антител в РТГА ( $\log_2$ )					
	1	3	1	2	3	4	6	8
1	4,6 $\pm$ 0,3* 10/10**	3,2 $\pm$ 0,3 4/10	7,8 $\pm$ 0,2* 10/10	7,5 $\pm$ 0,2* 10/10	5,9 $\pm$ 0,2* 10/10	6,1 $\pm$ 0,2* 10/10	4,8 $\pm$ 0,2* 10/10	5,7 $\pm$ 0,2* 10/10
2	4,5 $\pm$ 0,3* 10/10	2,8 $\pm$ 0,4 2/10	7,3 $\pm$ 0,2* 10/10	7,6 $\pm$ 0,2* 10/10	6,2 $\pm$ 0,2* 10/10	6,4 $\pm$ 0,2* 10/10	5,3 $\pm$ 0,3* 10/10	5,9 $\pm$ 0,3* 10/10
3	0 0/10	0 0/10	0 0/10	0 0/10	0 0/10	0 0/10	0 0/10	0 0/10

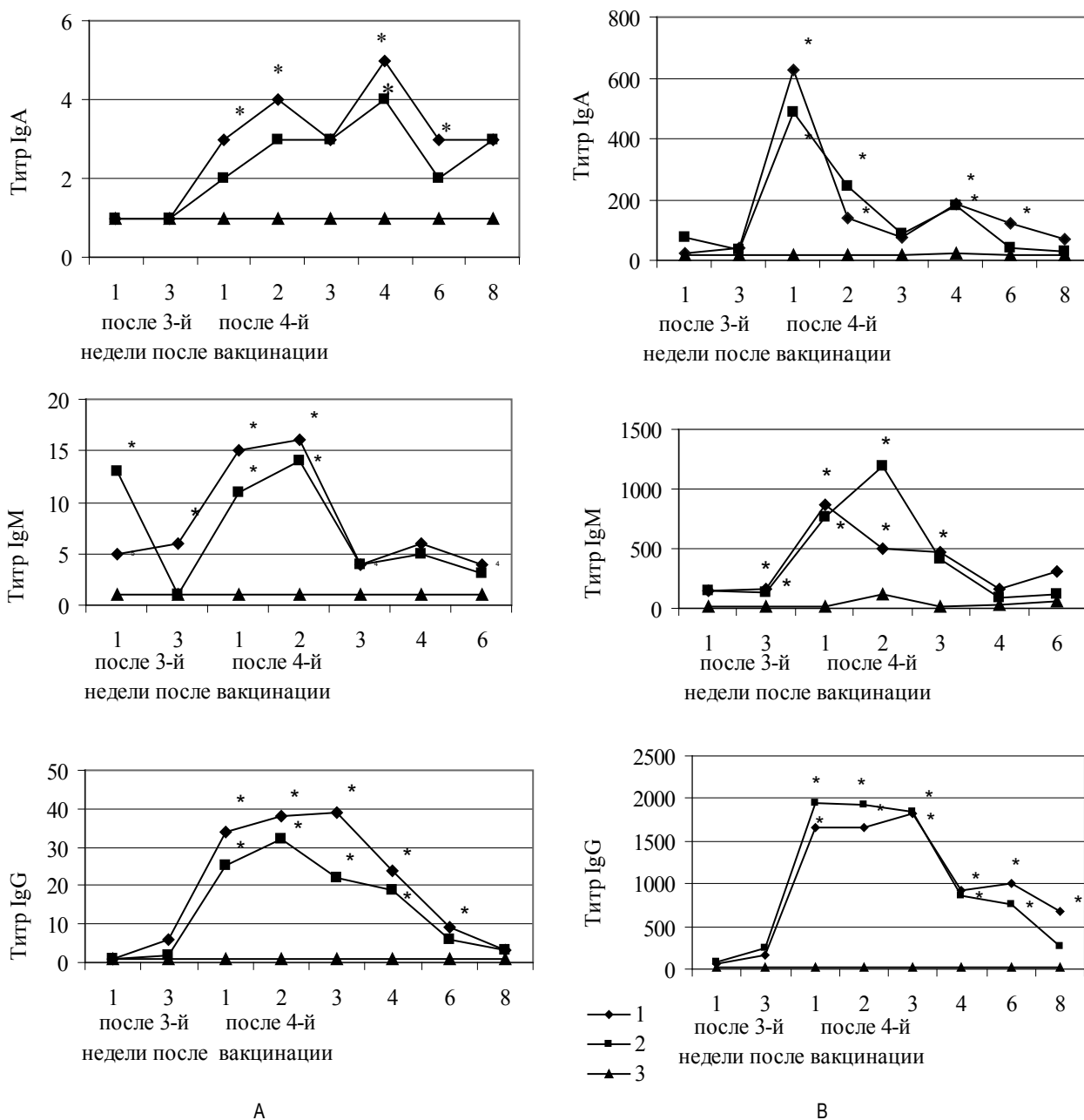
**Примечания:** Группы: № 1 – АГ ВНБ+эмульсиген®-D, № 2 – АГ ВНБ+ФБР, № 3 – контроль (отрицательный). \* – среднее значение титров антител для вакцинированных цыплят существенно отличалось от среднего значения титров контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

\*\* – положительные пробы/общее количество проб

Полученные результаты показали, что через 1 неделю после третьей вакцинации у всех привитых цыплят были выявлены антитела к вирусу НБ. При дальнейшем изучении уровня специфического гуморального иммунного ответа было отмечено снижение количества позитивных проб крови. После четвёртой вакцинации уровень гемагглютинирующих антител в крови вакцинированных цыплят существенно увеличивался, при этом выявляемые титры антител находились в диапазоне от 5,0 до 7,0 log<sub>2</sub>. Пик выработки антител отмечали через 1 и 2 недели после 4-й вакцинации для 1 и 2 групп, соответственно. Существенной разницы в уровне гемагглютинирующих антител в крови цыплят между группами не наблюдали. У цыплят контрольной группы антител к вирусу НБ в течение всего периода исследования не выявляли.

При исследовании сывороток крови в ИФА (данные не показаны) в крови цыплят 1-й группы был выявлен более высокий уровень IgG, чем во 2-й группе. Более высокий уровень IgM напротив был выявлен в сыворотках крови цыплят второй группы, иммунизированных одним антигеном без адьюванта.

На рисунке представлены результаты выявления иммуноглобулинов трёх классов (IgA, IgM и IgG) в трахеальных смывах и слезной жидкости цыплят методом ИФА. При исследовании пробы трахеальных смывов, отобранных от вакцинированных цыплят после 3-й вакцинации, были выявлены антитела класса IgM в обеих группах и класса IgG у цыплят 1-й группы. В слезной жидкости цыплят после третьей вакцинации были выявлены специфические IgM и IgG в небольших титрах.



**Рис.** Результаты выявления специфических к вирусу НБ иммуноглобулинов в трахеальных смывах (А) и слезной жидкости (В) цыплят, № 1 – АГ ВНБ+эмульсиген®-D, № 2 – АГ ВНБ+ФБР, № 3 – контроль. Титр иммуноглобулинов выражен величиной, обратной разведению пробы секреторной жидкости

**Примечание:** \* – среднее значение титров антител для вакцинированных цыплят существенно отличалось от среднего значения титров контрольной группы (p<0,05)

После 4-й вакцинации было отмечено существенное увеличение уровня специфических иммуноглобулинов в слёзной жидкости и трахеальных смывах цыплят. При этом пик выработки иммуноглобулинов класса М был отмечен через 1–2 недели, а класса G – через 2–3 недели после 4-й вакцинации. Максимальный уровень IgA в слёзной жидкости был выявлен через 1 неделю, а в трахеальных смывах – через 4 недели после 4-й вакцинации. Наличие существенной разницы между 1 и 2 группами было отмечено в количестве IgG, выявленном в трахеальных смывах через 3 недели и в слёзной жидкости – через 8 недель после последней вакцинации (в 1 группе в 2 и 3 раза больше, чем во второй).

Полученные нами результаты подтверждают данные других авторов [3, 4], что местное введение инактивированного вируса и мукозальных адьювантов стимулировало выработку антител в верхнем респираторном тракте и слёзной жидкости цыплят и системную индукцию антител в крови.

Для оценки эффективности стимуляции клеточного иммунитета у цыплят в различные сроки после первой вакцинации проведены исследования фенотипических изменений в иммунограмме птиц. Полученные результаты показали, что наибольшая активация иммунокомпетентных клеток у цыплят, привитых вакциной с эмульсигеном®-D, была отмечена после 3-й вакцинации. При этом объём позитивных CD4, CD8α и CD3 T-клеток в крови этих цыплят был в 2; 1,3–1,5 и 1,4–1,3 раза больше, чем у птиц, вакцинированных одним антигеном вируса НБ и контрольных, соответственно. Это подтверждает данные других исследователей по усилению активации клеточного звена иммунитета при местном применении инактивированных вирусов совместно с адьювантами [5].

Таким образом, введение дополнительной 4-й прививки при использовании мукозальной инактивированной вакцины против НБ вызывало существенное усиление мукозального и системного иммунного ответа.

**Выводы.** Было установлено, что 4-кратная иммунизация экспериментальной вакциной против НБ с адьювантом эмульсиген®-D являлась оптимальной для создания необходимой продолжительности иммунитета перед применением традиционной инактивированной вакцины, так как в этом случае помимо формирования местного иммунитета происходит значительная активизация гуморального иммунного ответа.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ 3460р.

#### Список литературы

1. Применение иммуноферментной тест-системы для выявления специфических IgA, IgM и IgG к вирусу ньюкаслской болезни птиц в секреторных жидкостях и сыворотках крови кур [Текст] / М.А. Волкова [и др.] // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2007. – Т. 6. – С. 176–185.
2. Протективные свойства экспериментальной мукозальной вакцины против ньюкаслской болезни [Текст] / М.А. Волкова, И.А. Чвала, А.В. Ирза // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 5. – С. 10–12.
3. A lack of antibody formation against inactivated influenza virus after aerosol vaccination in presence or absence of adjuvantia [Text] / E.D. Geus [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2011. – Vol. 143. – P. 143–147.
4. Effect of lipopolysaccharide on intranasal administration of liposomal Newcastle disease virus vaccine to SPF chickens [Text] / L.P. Tseng [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2009. – Vol. 3. – P. 285–289.
5. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines [Text] / F. Rauf [et al.] // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 3631–3642.
6. Rabies DNA vaccine encoding lysosome targeted glycoprotein supplemented with EMULSIGEN D confers complete protection in pre-and post-exposure studies in BALB mice [Text] / M. Kaur [et al.] // FASEB J. – 2010. – Vol. 24. – P. 173–183.

#### APPLICATION OF MUCOSAL VACCINE WITH ADJUVANT EMULSIGEN®-D AGAINST NEWCASTLE DISEASE

Volkova M.A., Chvala I.A., Irza A.V., Dolgov D.L.

FGBI «Federal Centre for Animal Health», Vladimir, Russia

Kapczynski D.P.

ARS SERPL, USA

*The present study describes the immunogenic properties of mucosal vaccine against Newcastle disease with Emulsigen®-D by fourfold intranasal-intraocular administration. The additional fourth inoculation in 21 days after the third vaccination induced the significant increasing of antibody titer in sera, lacrimal fluids and tracheal lavages of chicken that have been tested in HI test and ELISA in comparison with threefold vaccination. The activation of immune competent cells of chicken inoculated with experimental vaccine has significantly higher expression after the third vaccination.*

УДК 577.11:542.951.1:615.281

#### ПЕРСПЕКТИВА РОЗРОБКИ ВАКЦИННИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ АЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ ІМУНОГЕННИХ БІОПОЛІМЕРІВ *P. AERUGINOSA*

Волянська Н.П.

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

Класичні інфекційні хвороби та гнійно-запальні захворювання мікробного генезу і сьогодні відіграють вельми важливу роль в формуванні основних показників здоров'я населення України, викликають занепокоєність не лише за причин значної поширеності та економічних збитків, але і через реальну загрозу існуванню нації. У країні реєструється понад 150 нозологічних форм інфекційних хвороб, в останнє десятиріччя захворюваність на них складає третину від захворюваності загальної [1–3].

Одну з нагальних проблем сучасної гуманної та ветеринарної медицини складають псевдомонози, захворювання, які являють загрозу для вельми широких верств населення і тварин. За останні десятиріччя навіть в економічно розвинених країнах нозокоміальні та внутрішньолікарняні інфекції не мають чіткої тенденції до зниження (по критеріям поширеності та захворюваності), призводять до великих економічних збитків, суттєвого погіршення якості життя, соціальних негараздів (вельми часта хронізація гнійно-запального процесу та як наслідок - інвалідність потерпілого). Не винятком є і синьогнійна інфекція з важким перебігом хвороби, що ускладнюється сепсисом, враженням самих різних органів і систем. У медицині псевдомонози особливо агресивно проявляють себе в хірургічних стаціонарах, опікових клініках, соматичних лікарнях самого різного профілю; у ветеринарії – у тварин самих різних видів, домашньої птиці, часто страждає племінний контингент, що має відлуння в ряду поколінь. Проблема синьогнійної інфекції з сугубо медичної та ветеринарної неухильно трансформується в соціальну, економічну та політичну [4–7].