



Влияние композиционного состава и дисперсности масляной фазы на антигенную активность ассоциированной инактивированной вакцины против инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости-76

Дубовой А.С., старший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц

Самусева Г.Н., старший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц

Бочкарев В.С., кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц

Бакулин В.А., доктор ветеринарных наук, зав. отделом вирусологии и опухолевых болезней птиц

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства (ВНИВИП) – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН

Аннотация: Представлены данные исследования трех образцов инактивированной эмульгированной ассоциированной вакцины против инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости-76 (ИБК+НБ+ССЯ-76) на базе масляного адьюванта ISA-15 (М/В): референс-вакцина – (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15); экспериментальный образец 1 – (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) с наноразмерной дисперсной фазой после обработки на гомогенизаторе высокого давления; экспериментальный образец 2 – (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК/ISA-15-Нано) с наноразмерной дисперсной фазой после обработки на гомогенизаторе высокого давления и введенным в дисперсионную среду сополимером акриловой кислоты (СоАК). Экспериментально показано, что повышение дисперсности вакцины до наноразмерности позволяет усилить иммунный ответ у вакцинированных цыплят, а включение в ее состав СоАК генерирует наиболее высокий уровень поствакцинальных антител.

Ключевые слова: инфекционный бронхит кур, ньюкаслская болезнь, синдром снижения яйценоскости-76, ассоциированная инактивированная вакцина, антигенная активность, масляный адьювант, сополимер акриловой кислоты.

Введение. Концепция стимуляции иммунного ответа организма – это основа вакцинации. Вакцины действуют, инициируя врожденный иммунный ответ и активируя антигенпрезентирующие клетки, тем самым, вызывая защитный адаптивный иммунный ответ на антиген патогена. Любые инактивированные вакцины содержат в своем составе антигены возбудителей, которые обеспечивают специфичность иммунного ответа, и адьюванты, роль которых заключается в усилении это-

го иммунного ответа. Такие композиции позволяют значительно повышать иммуногенность препаратов, увеличивать скорость развития и продолжительность иммунного ответа у вакцинированных животных [1-3].

С быстрым накоплением знаний о механизме взаимодействия иммунной системы с патогенами произошел качественный скачок в развитии концепции стимулирования иммунного ответа организма, и на смену ранним представлениям о действии адьюван-

тов исключительно в качестве механических «депо антигенов» в местах введения пришло более глубокое понимание роли адьювантов в проведении эффективной вакцинопрофилактики. Важнейшей задачей вакцинологии является поиск новых адьювантов, действующих непосредственно на иммунокомпетентные клетки и стимулирующих формирование выраженного адаптивного иммунного ответа [4].

У стандартных инактивированных эмульгированных вакцин



средний размер капелек дисперсной фазы составляет, как правило, 3-6 мкм, повышение же дисперсности системы до наноразмерности придает препарату особые физико-химические и биологические свойства, которые могут значительно отличаться от исходных. Такие системы обладают более высокой иммуногенной и антигенной активностью благодаря лучшей доступности для макрофагов и последующей презентации клеткам иммунной системы [5].

Перспективным направлением в разработке новых адъювантов является использование в этом качестве высокомолекулярных полимеров, обладающих иммуномодулирующей активностью. Примером, демонстрирующим принципиальную возможность создания нетоксичных иммуностимулирующих полиэлектролитов, могут служить сополимеры акриловой кислоты, которые практически лишены токсических свойств, но сохраняют иммуностимулирующее действие [6].

Полиакриловая кислота (ПАК) является полиэлектролитом, обладающим собственной физиологической активностью, в частности, способностью к активации ретикуло-эндотелиальной системы. ПАК проявляет иммуностимулирующую, противовирусную и противоопухолевую активность. Кроме того, оказалось, что ПАК при введении совместно с эритроцитами барана в несколько раз усиливает иммунный ответ на этот типичный тестовый антиген, т.е. выступает в качестве иммуностимулятора [7,8]. Экспериментально показано, что ПАК и ее сополимеры являются эффективными адъювантами при изготовлении противоящурных вакцин

для крупного рогатого скота и свиней, активно стимулируя иммунный ответ и способствуя созданию напряженного иммунитета [9].

Известно также, что при комбинации адъювантов их активность суммируется, что ведет к усилению стимулирующего действия [10].

Цель настоящей работы – изучить антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости-76 в зависимости от ее композиционного состава и дисперсности системы.

Материал и методика исследований. Для исследований были использованы эмбрионы кур и уток 9-10-суточного срока инкубации, вариантный вирус инфекционного бронхита кур (ИБК), вирус ньюкаслской болезни (НБ), вирус синдрома снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76), сополимер акриловой кислоты (СоАК), масляный адъювант Montanide ISA 15 A VG (M/B), цыплята 30-суточного возраста.

Для накопления вирусосодержащего материала ИБК эмбрионы кур заражали штаммом «ГС-11» в аллантоисную полость, инокулируя в каждый эмбрион по 0,2 см³ вируса в дозе 10^{4,7} ЭИД₅₀. Для накопления вирусосодержащего материала НБ эмбрионы кур заражали вирусом в аллантоисную полость, инокулируя 0,1 см³ вируса НБ (штамм «Ла-Сота») с биологической активностью 10⁴ ЭИД₅₀. Для накопления вирусосодержащего материала ССЯ-76 утиные эмбрионы заражали вирусом в аллантоисную полость, инокулируя 0,2 см³ вируса ССЯ-76 (штамм «В8/78») с гемагглютинирующей активностью 8 log₂.

Для оценки биологической активности накопленного вирусного материала использовали метод титрования вирусов ИБК и НБ на развивающихся эмбрионах кур и метод расчета титров по Керберу в модификации Ашмарина. Активность вируса ССЯ-76 оценивали в реакции гемагглютинации (РГА). Инактивацию вирусов НБ и ИБК проводили теотропином в конечной концентрации 0,15% в течение 36 ч при температуре 37,0±0,5°C.

После изготовления образцы вакцин контролировали по следующим параметрам: стерильность, стабильность эмульсии, вязкость, полнота инактивации, безвредность и антигенная активность.

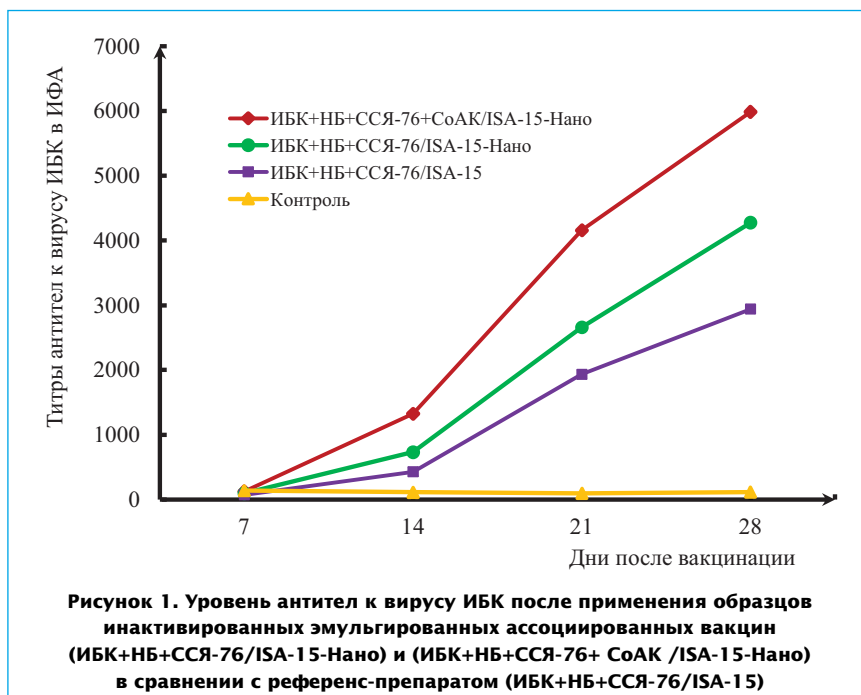
Контроль стерильности изготовленных образцов проводили в соответствии с ГОСТ 28085. Стабильность эмульсии определяли методом термостатирования образцов при 37,0±0,5°C в течение 30 сут. Эмульсию считали стабильной, если после испытания не наблюдалось ее расслоения на водную и масляную фазы. Кинематическую вязкость оценивали вискозиметром ВПЖ-2. Нормативное значение кинематической вязкости вакцины составляет 20-150 мм²/с. Контроль полноты инактивации образцов вакцины выполняли методом трех последовательных пассажей на развивающихся эмбрионах кур (ИБК, НБ) и уток (ССЯ-76).

Безвредность инактивированных образцов вакцин проверяли на цыплятах (по 10 голов в каждой группе), которым вводили четырехкратную дозу препарата (2,0 см³). Срок наблюдения составлял 20 дней. Вакцину считали безвредной, если иммунизированные цыплята в течение срока



Таблица 1. Результаты исследований образцов инактивированных эмульгированных ассоциированных вакцин (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано), (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК/ISA-15-Нано) и референс-препарата (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15) на стерильность, полноту инактивации, стабильность и вязкость эмульсии, безвредность

Образец вакцины	Стерильность	Полнота инактивации	Стабильность эмульсии	Вязкость, мм ² /с	Безвредность
ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано	стерильна	Полностью инактивирована	стабильна	38	безвредна
ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК/ISA-15-Нано	стерильна	Полностью инактивирована	стабильна	43	безвредна
ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15	стерильна	Полностью инактивирована	стабильна	32	безвредна



наблюдения оставались живыми, без клинических признаков переболевания, а при вскрытии птицы на месте введения вакцины отсутствовали выраженная воспалительная реакция и некроз тканей.

Антигенную активность компонента ИБК оценивали по титрам поствакцинальных антител в ИФА в соответствии с инструкцией по применению набора производства фирмы BioChek. Антигенную активность компонентов НБ и ССЯ-76 оценивали по титрам поствакцинальных антител в РТГА. Для этого цыплят опытных групп (по 35 голов в каждой) иммунизировали изготовленными образцами вакцин, оставляя 10 голов цыплят в качестве чистого контро-

ля. Через 7, 14, 21 и 28 дней после иммунизации у цыплят брали кровь, получали сыворотки и проводили серологические исследования в ИФА на наличие антител к вирусу ИБК и в РТГА на наличие антител к вирусам НБ и ССЯ-76.

Вакцину считали антигенно активной по компоненту ИБК, если титры поствакцинальных антител к вирусу ИБК через 28 дней не менее чем в 2 раза превышали минимальный положительный титр, указанный в инструкции ИФА набора BioChek (1:834) при отрицательном иммунном фоне (уровень титров антител к вирусу ИБК у цыплят контрольной группы), или не менее чем в 2 раза превышали уровень поло-

жительного иммунного фона, и при этом прирост титров антител у цыплят контрольной группы за период опыта не наблюдался.

Вакцину считали антигенно активной по компонентам НБ и ССЯ-76, если через 28 дней после вакцинации уровень сывороточных антител у 80% привитых цыплят в 4 и более раза превышал показатели контрольных цыплят и имел значение не ниже 4,0 log₂ в РТГА для компонента НБ и не ниже 5,0 log₂ для компонента ССЯ-76.

Результаты исследований и обсуждение. Полученные вирусодержащие материалы вируса ИБК с биологической активностью 10^{7,6} ЭИД_{50/см}³, вируса НБ с биологической активностью 10^{10,3} ЭИД_{50/см}³, а также вируса ССЯ-76 с геагглютинирующей активностью 12,0 log₂ после инактивации теотропином контролировали на полноту инактивации и стерильность.

Из полученных антигенов вирусов ИБК, НБ и ССЯ-76 были изготовлены три образца ассоциированной инактивированной эмульгированной вакцины против инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни и синдрома снижения яйценоскости-76. Первый образец (референс-вакцина) – (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15) на базе масляного адьюванта ISA-15 (M/B), ее получали методом гомогенизации водного и

масляного компонента с помощью гомогенизатора Ultraturrax T-25. Второй образец вакцины – (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) – аналогичен первому, но после гомогенизации на Ultraturrax T-25 препарат был обработан на гомогенизаторе высокого давления EmulsiFlex-C5, благодаря чему размер капель дисперсной фазы достигал 500-600 нм. Третий образец вакцины – (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК/ISA-15-Нано) – аналогичен второму, но в дисперсионную среду был предварительно введен СоАК в конечной концентрации 0,1%. Все вакцины содержали в своем составе одинаковое количество антигенов ИБК, НБ и ССЯ-76.

Результаты исследований препаратов на стерильность, полноту инактивации, стабильность и вязкость эмульсии, безвредность представлены в табл. 1.

Результаты исследований нанопрепаратов в сравнении с референс-препаратом на антигенную активность по компонентам ИБК, НБ и ССЯ-76 представлены на рис. 1, 2 и 3 соответственно.

Как видно из графиков, антигенная активность образцов инактивированных эмульгированных ассоциированных вакцин (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) и (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК /ISA-15-Нано) по всем компонентам (ИБК, НБ и ССЯ-76) значительно превосходит референс-препарат (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15).

Заключение. Проведенные исследования показали, что: 1) включение в компонентный состав экспериментального образца инактивированной вакцины (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК/ISA-15-Нано) дополнительного стимулятора иммуногенеза (СоАК) не повлияло на безвредность вакцины,

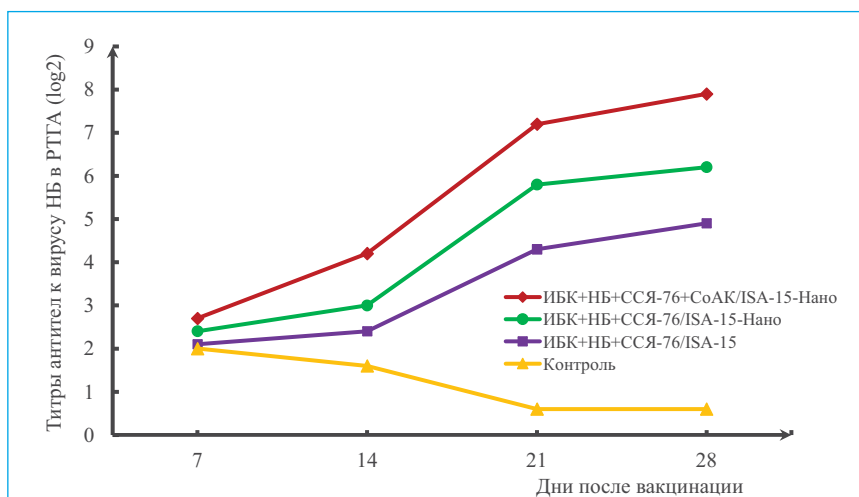


Рисунок 2. Уровень антител к вирусу НБ после применения образцов инактивированных эмульгированных ассоциированных вакцин (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) и (ИБК+НБ+ССЯ-76+ СоАК /ISA-15-Нано) в сравнении с референс-препаратом (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15)

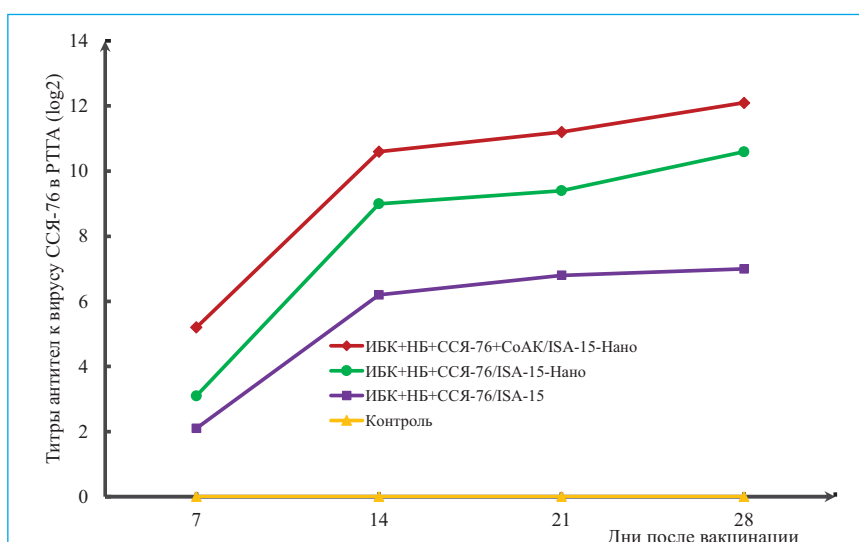


Рисунок 3. Уровень антител к вирусу ССЯ-76 после применения образцов инактивированных эмульгированных ассоциированных вакцин (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) и (ИБК+НБ+ССЯ-76+ СоАК /ISA-15-Нано) в сравнении с референс-препаратом (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15)

стабильность эмульсии и вязкость препарата; 2) экспериментальные образцы инактивированной вакцины (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15-Нано) и (ИБК+НБ+ССЯ-76+СоАК /ISA-15-Нано) индуцируют более высокий уровень иммунного ответа по сравнению с референс-препаратом (ИБК+НБ+ССЯ-76/ISA-15); 3) повышение дисперсности вакцины до наноразмерности позволяет усилить иммунный ответ у вакцинированных цыплят, а включение в ее состав СоАК ге-

нерирует наиболее высокий уровень поствакцинальных антител.

Литература

- Исаенко Е.Ю. Адьюванты в современной вакцинологии / Е.Ю. Исаенко, Е.М. Бабиц, И.В. Елисева, Л.А. Ждамарова, В.И. Белозерский, С.А. Колпак // Annals of Mechnikov Institute. - 2013. - No 4. - С. 5-21.
- Singh M. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants / M. Singh, D.T. O'Hagan // Intl. J. Parasitol. - 2003. - V. 33, No 5-6. - P. 469-478.



3. Di Pasquale A. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond / A. Di Pasquale, S. Preiss [et al.] // *Vaccines*. - 2015. - V. 3, No 2. - P. 320-343.
4. Семакова А.П. Адьювантные технологии в создании современных вакцин / А.П. Семакова, Н.И. Микшис // *Пробл. особо опасных инф.* - 2016. - №2. - С. 28-35.
5. Kim M.G. Nanotechnology and vaccine development / M.G. Kim, J.Y. Park, Y. Shon [et al.] // *Asian J. Pharm. Sci.* - 2014. - V. 9. - P. 227-235.
6. Васильева Д.В. Иммуноадьюванты: классификация и их применение в фармацевтическом производстве / Д.В. Васильева, М.С. Григорьева, Е.В. Ворфоломеева [и др.] // *Разработка и регистрация лек. средств*. - 2017. - №3. - С. 80-88.
7. Кабанов В.А. От синтетических полиэлектролитов к полимер-субъединичным вакцинам // *Лекции лауреатов Демидовской премии (1993-2004)*. - Екатеринбург: Уральский ун-т, 2006. - С. 412-447.
8. Соловский М.В. Модификация физиологически активных веществ полимерами. - СПб.: Политехнич. ун-т, 2012. - 114 с.
9. Ключкина Н.Д. Изучение токсических и адьювантных свойств полиакриловой кислоты и ее сополимеров // *Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Мат. Междунар. науч. конф., посв. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ*. - Владимир, 2003. - С. 403-405.
10. Wack A. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. / A. Wack, B. Baudner, A. Hilbert [et al.] // *Vaccine*. - 2008. - V. 26, No 2. - P. 552-561.

Для контакта с авторами:

Дубовой Александр Сергеевич

E-mail: alexsd07@mail.ru

Самусева Галина Николаевна

E-mail: samgally@mail.ru

Бочкарев Владимир Сергеевич

E-mail: vladbochkarev@gmail.com

Бакулин Валерий Александрович

E-mail: hawx_93@mail.ru

The Effects of the Composition and Dispersion of the Oil Phase on the Antigenicity of the Associated Inactivated Vaccine against Chicken Infectious Bronchitis, Newcastle Disease, and Egg Drop Syndrome-76

Dubovoy A.S., Samuseva G.N., Bochkarev V.S., Bakulin V.A.

Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Institute of Poultry" of Russian Academy of Sciences

Summary: *The antigenicity of three inactivated emulsified associated vaccines against viruses of chicken infectious bronchitis (IB), Newcastle disease (ND), and egg drop syndrome-76 (EDS-76) based on the oil adjuvant ISA-15 (O/W) was comparatively studied: 1) reference vaccine (IB+ND+EDS-76/ISA-15); 2) experimental vaccine (IB+NB+EDS-76/ISA-15-Nano) with a nanoscale-dispersed oil phase obtained by the use of a high-pressure homogenizer; 3) similar nano-scale vaccine (IB+NB+EDS-76+CoAA/ISA-15-Nano) additionally supplemented with a copolymer of acrylic acid (CoAA). The in vivo tests of the vaccines on the chicks evidenced that both nano-scale vaccines enhanced the immune response in vaccinated chicks as compared to the reference vaccine and that supplementation with CoAA resulted in the highest postvaccinal antibody titers.*

Keywords: *chicken infectious bronchitis, Newcastle disease, egg drop syndrome-76, associated inactivated vaccine, antigenic activity, oil adjuvant, copolymer of acrylic acid.*

ОТРАСЛЕВЫЕ НОВОСТИ

Эпизоотическая ситуация по особо опасным болезням животных в мире с 27 ноября по 3 декабря 2021 года

За период с 27 ноября по 3 декабря 2021 года во Всемирную организацию охраны здоровья животных (МЭБ) поступили сообщения из 28 стран мира о регистрации 210 очагов особо опасных болезней животных. Соответствующие нотификации были опубликованы на официальном сайте МЭБ/OIE.

Высокопатогенный грипп птиц отмечен на территории Австрии (1), Бельгии (4), Великобритании (20), Германии (18), Ирландии (16), Италии (37), Люксембурга (2), Нидерландов (6), Норвегии (2), Сербии (1), Франции (4), Хорватии (1), Чешской Республики (2), Швеции (2), Эстонии (3), Израиля (1), Индии (1), Ирана (4), Китая (1) и Южной Кореи (5). Заболевание, вызванное вирусами подтипов H5, H5N1 и H5N5 отмечено среди птиц сельскохозяйственного назначения и дикой птицы.

Источник: пресс-служба ФГБУ «ВНИИЗЖ»