

УДК 619:615.37:636.028:611.018:612.017

Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор
Красочко И.А., доктор ветеринарных наук, профессор
Высокоморная О. В., аспирант*

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск
УО «Гродненский государственный аграрный университет», г. Гродно

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЯ АНТИТЕЛ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕЙ ЖИВОТНЫХ НА ВВЕДЕНИЕ ВАКЦИН С МАСЛЯНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ

Резюме

В статье приведены результаты изучения тканевой реакции у лабораторных животных при введении вакцины с различными масляными адьювантами – Montanide ISA 70, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 и Эмульсиген 10%. Установлено, что при использовании адьювантов Эмульсиген 10%, Montanide ISA 15, Montanide ISA 70, Montanide ISA 206 в мышечной ткани отмечают наличие некротизированных клеток и интенсивной пролиферации лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

Summary

In this study, the tissue reaction in laboratory animals when administered vaccines with different adjuvants oil – Montanide ISA 70, Montanide ISA 15, Montanide ISA 206 and Emulsigen 10%. Found that the use of adjuvants Emulsigen 10%, Montanide ISA 15, Montanide ISA 70, Montanide ISA 206 report the presence of muscle cells and nekrotizirovannyh intensive proliferacion of lymphoid cells in situ necrotic detritus.

Поступила в редакцию 07.10.2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

В 1925 г. Г. Рамон установил, что некоторые вещества способны усиливать процессы иммуногенеза. Эти вещества были названы адьювантами (adjuvant – полезный, помогающий). К адьювантам относят антигенные и неантигенные субстанции, оказывающие неспецифическое стимулирующее влияние на иммунные реакции [1].

Инактивированные вирусы в чистом виде обладают низкой иммунологической активностью, поэтому при конструировании вакцин необходимо использовать адьюванты (в качестве неспецифического стимулятора иммунитета). Адьюванты обладают рядом преимуществ: направляют и оптимизируют иммунный ответ, ускоряют опосредованные клетками реакции, усиливают иммуногенные свойства слабых иммунных компонентов [10].

Выбор адьювантов для вакцины должен быть основан на анализе потенциального преимущества адьюванта для усиления иммуногенности вакцины, соотношенного с риском индуцирования местных и системных реакций [7].

Хотя существует большое количество веществ с адьювантными свойствами, до недавних пор в ветеринарии применялся лишь небольшой перечень из них: гидроокись алюминия (ГОА), минеральные масла, сапонин. В связи со стремлением снизить количество побочных эффектов при использовании адьювантов в процессе развития и усовершенствования технологий производства вакцин существующие адьюванты были усовершенствованы и разработаны новые [8].

Компаниями MVP Laboratories, Inc. и Sepic были разработаны новые серии адьювантов – эмульсиген (Emulsigen) и ИЗА (ISA). Данные адьюванты представляет собой молочно-белую эмульсию типа масло в воде, предназначенную для смешивания непосредственно с вакцинными антигенами без какой-либо дальнейшей обработки для повышения иммуногенности готовой вакцины [2].

Механизм действия этих адьювантов заключается в эмульгировании антигена в масляную оболочку путем образования «эмульсионного шарика». Для усиления иммунного ответа антиген должен находиться внутри капель воды, диспергированных в ли-

пидной фазе. Эмульсии освобождают антиген в течение более длительного времени, чем сорбированные вакцины, что может объяснить более напряженный и длительный иммунитет организма на вводимый антигенный компонент [4].

Общим недостатком эмульсионных вакцин на основе обратной эмульсии является их относительно высокая вязкость и, как следствие, сильная тканевая реакция в точке введения, которая может проявиться отеком, развитием хронического воспаления, инкапсулированием вакцины [5,6,9].

При вакцинации животных необходимо стремиться к получению максимального эффекта при минимальных побочных явлениях, однако в доступной литературе сведений о клеточной реакции на введение вакцин с масляными адъювантами нами не обнаружено [3].

Целью исследования было изучение тканевой реакции и уровня выработки антител у лабораторных животных при введении вакцины с различными масляными адъювантами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыт проводился на базе вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского».

В качестве тест-объекта использовали инактивированные теотропином штаммы вируса инфекционного ринотрахеита (ИРТ) – КМИЭВ 7 (титр вируса 7,0 Ig ТЦД 50/мл) и *Proteus mirabilis* – КМИЭВ 44 (концентрация 2,0 млрд. микробных тел в 1 мл). Для изучения влияния вакцины на ткань использовали следующие адъюванты: эмульсиген 10%, Montanide ISA 15, Montanide ISA 70, Montanide ISA 206.

Для изучения тканевой реакции после вакцинации использовали лабораторных животных – белых крыс. Животных разделили на 5 групп по 4 головы в группе, которым вводили вирусно-бактериальную вакцину (ИРТ + *Proteus mirabilis*) с различными адъювантами. Крысам первой опытной группы вводили внутримышечно по 1,0 мл вирусно-бактериальной вакцины с адъювантом Эмульсиген; во второй группе с адъювантом Montanid ISA 15, в третьей – с адъювантом Montanid ISA 70, в четвертой – с адъюван-

том Montanid ISA 206, крысам пятой группы (контроль) вводили внутримышечно 1,0 изотонического раствора натрия хлорида.

Отбор тканей для гистологического исследования осуществлялся на 3 и 7 день после введения вакцины. Для фиксации материала использовался 10% нейтральный формалин. Обработка фиксированных тканей осуществлялась по общепринятой методике.

Для оценки гуморального иммунного ответа у животных после введения инактивированного вируса инфекционного ринотрахеита и возбудителя протейной инфекции с различными адъювантами у крыс проводили отбор крови до иммунизации, через 14 и 28 дней. Титр антител к вирусу ИРТ определяли в РНГА, а к *Proteus mirabilis* в РА по общепринятым методикам.

Цифровой материал экспериментальных исследований был подвергнут статистической обработке методами вариационной статистики с использованием компьютерной программы Bio-Stat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенных исследований при внутримышечном введении вакцины с различными адъювантами не отмечено гибели животных, на месте введения была небольшая припухлость и болезненность в первые дни после инъекции.

При проведении гистоисследований установлено, что у крыс контрольной группы мышечная ткань не имеет признаков инфильтрации, мышечные волокна ровные, без признаков воспаления (рисунок 1).

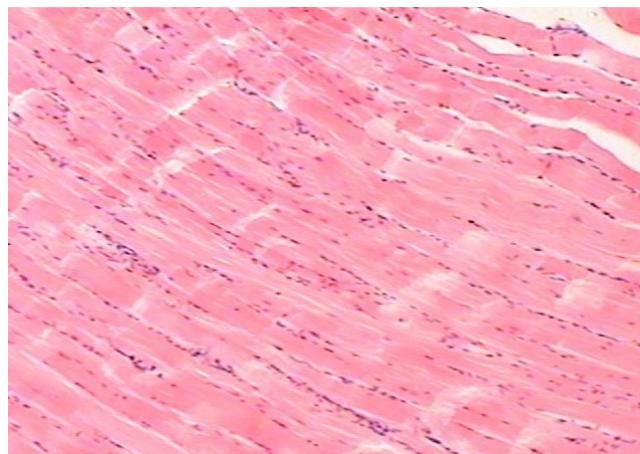


Рисунок 1 – Мышечная ткань у крыс контрольной группы

У крыс, которым вводилась вакцина, в мышечной ткани имелись изменения различной степени.

При изучении тканевой реакции у крыс на месте введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 206* характерные морфологические проявления представлены на рисунках 2 – 6. На представленных микрофотографиях видно, что через 3 суток после введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 206* в области введения отмечены слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции, фрагментация мышечных волокон. Имеются также интенсивные лимфоидные пролифераты с некрозом мышечных волокон, лимфоидный пролиферат по периферии мышц, слабая пролиферация в интерстиции. Через 7 суток на месте инъекции отмечена фрагментация мышечных волокон, разрастание соединительной ткани, а также некроз мышечных волокон, замещение пролифератами лимфоидных клеток некротизированной ткани.

Результаты изучения влияния вакцины с адъювантом *Montanide ISA 15* на месте введения представлены на рисунках 7 – 11.

Установлено, что через 3 суток после инъекции вакцины с адъювантом *Montanide ISA 15* на месте введения отмечены отек и фрагментация мышечных волокон, слабая лимфоидно-макрофагальная пролиферация.

На отдельных гистосрезях виден отек и некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация. Кроме того, имеется некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции. Через 7 суток на месте инъекции отмечена умеренная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции, фрагментация мышечных волокон, а также интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация.

При изучении местного воздействия вводимой вакцины с адъювантом *Montanide ISA 70* получены следующие результаты, приведенные на рисунках 12–16.

Через 3 суток после введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 70* на месте введения отмечены отек интерстиция, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции. Имеются слабые и крупные пролифераты в интерстиции мышцы и на месте некротизированных мышечных волокон. Через 7 суток отмечается отек интерстиция, слабая или умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции.

При изучении влияния вакцины с адъювантом *Эмульсиген 10%* полученные результаты представлены на рисунках 20 – 21.

Тканевая реакция у крыс на месте введения вакцины с адъювантом *Montanide ISA 15 206* через 3 суток после введения вакцины

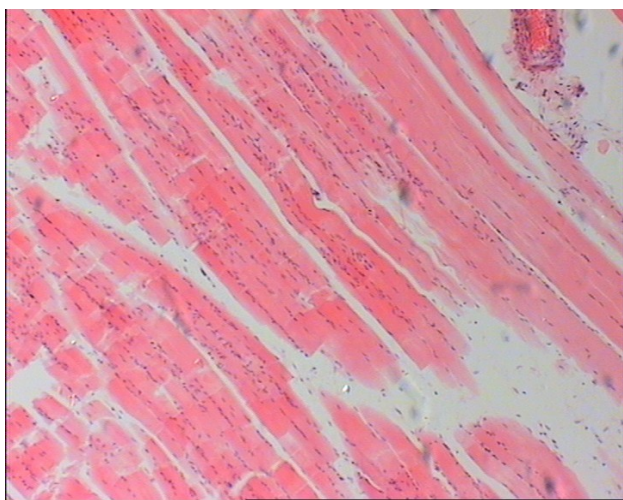


Рисунок 2 – Слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции

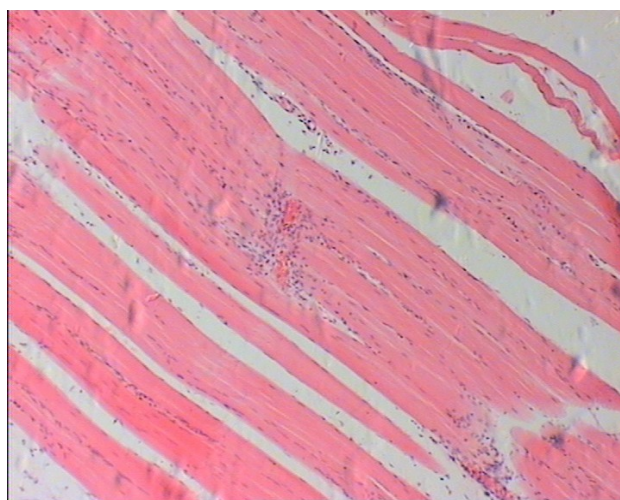


Рисунок 3 – Слабые пролифераты лимфоидных клеток в интерстиции, фрагментация мышечных волокон

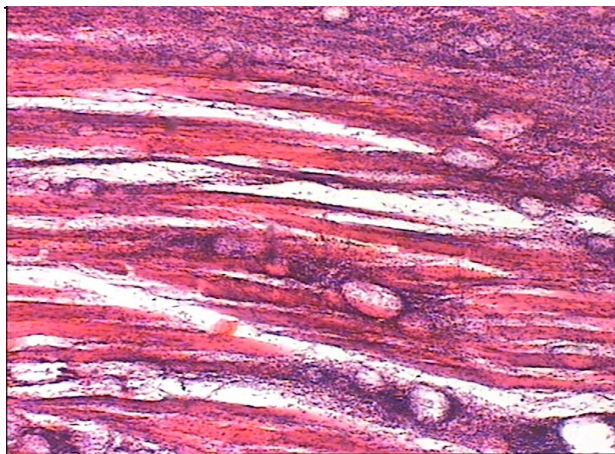


Рисунок 4 – Интенсивные лимфоидные пролифераты с некрозом мышечных волокон

на 7 сутки опыта

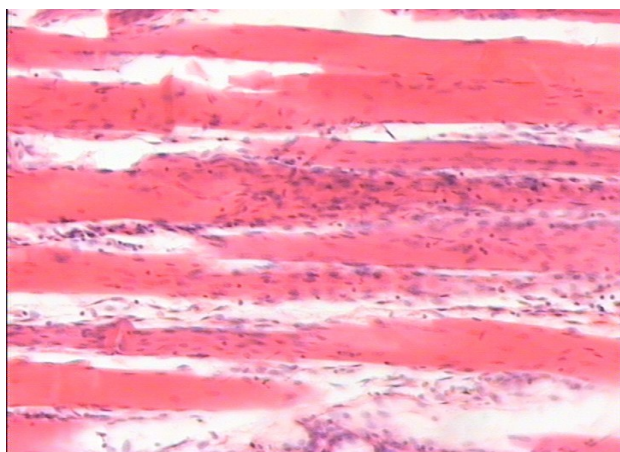
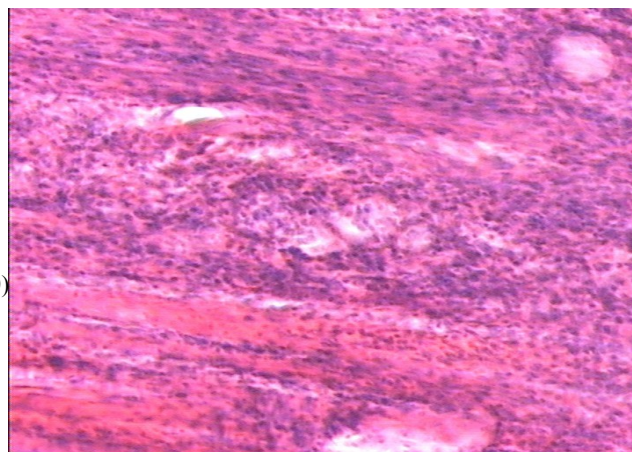


Рисунок 5 – Фрагментация мышечных волокон, разрастание соединительной ткани



(X100)

Рисунок 6 – Некроз мышечных волокон, замещение пролифератами лимфоидных клеток некротизированной массы

Тканевая реакция у крыс на месте введения вакцины с адьювантом *Montanide ISA 15* через 3 суток после введения вакцины

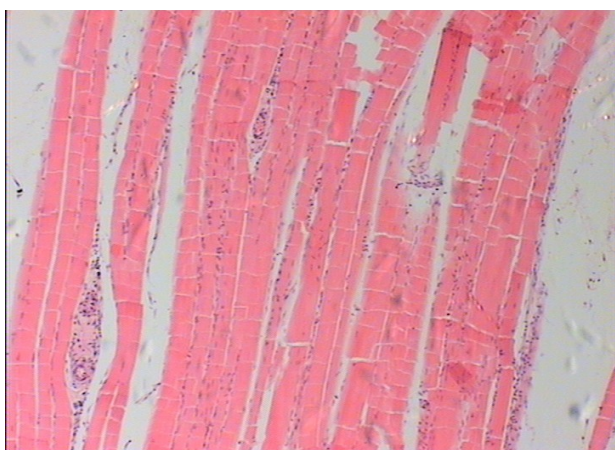


Рисунок 7 – Отек и фрагментация мышечных волокон, слабая лимфоидно-макрофагальная пролиферация

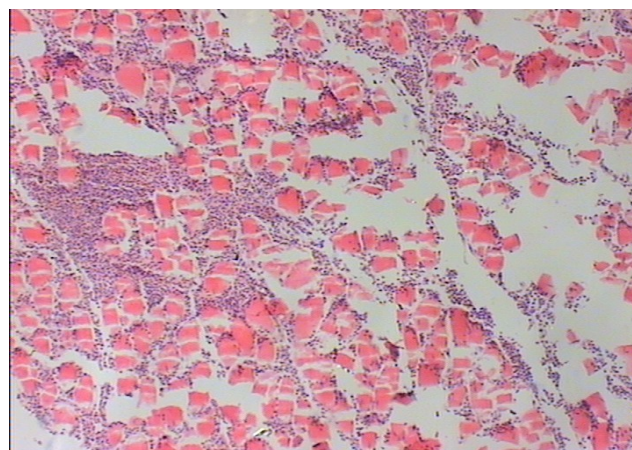


Рисунок 8 – Отек и некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

Тканевая реакция у крыс на месте введения вакцины
с адьювантом *Montanide ISA 15* через 3 суток после введения вакцины

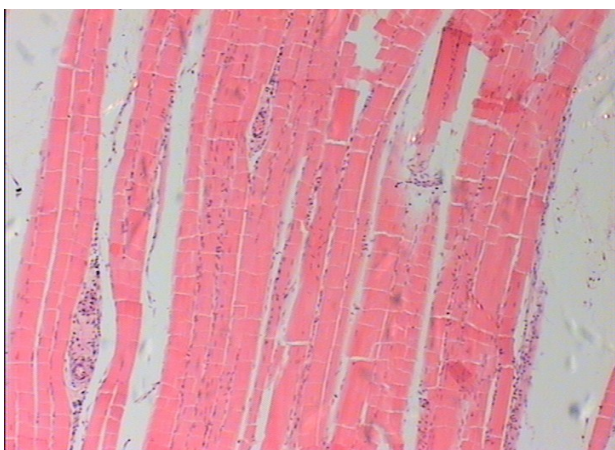


Рисунок 7 – Отек и фрагментация мышечных волокон, слабая лимфоидно-макрофагальная пролиферация

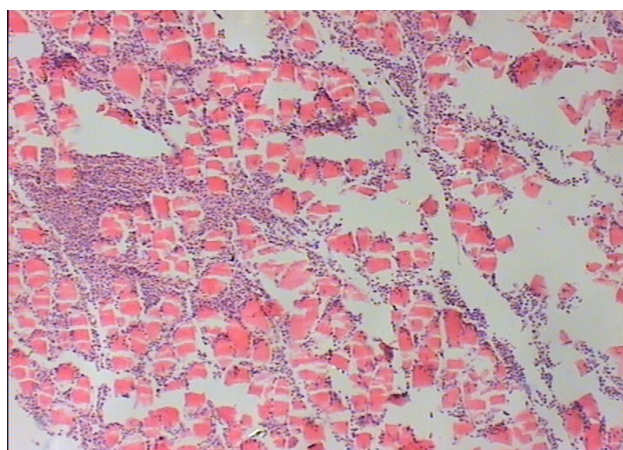


Рисунок 8 – Отек и некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

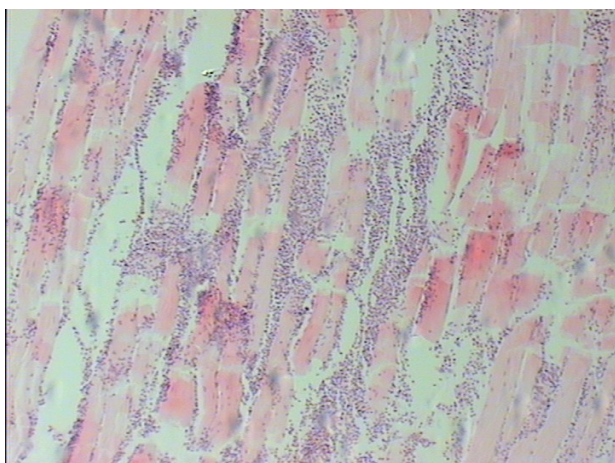


Рисунок 9 – Некротизация мышечных волокон, интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

на 7 сутки опыта

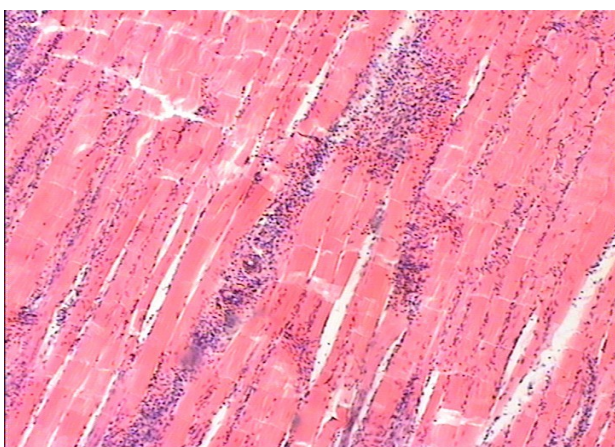


Рисунок 10 – Умеренная лимфоидно-макрофагальная пролиферация в интерстиции, фрагментация мышечных волокон

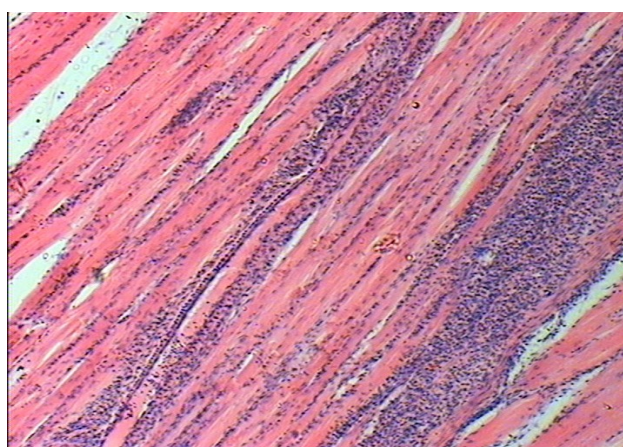


Рисунок 11 – Интенсивная лимфоидно-макрофагальная пролиферация

Тканевая реакция у крыс на месте введения вакцины
с адьювантом *Montanide ISA 70* через 3 суток после введения вакцины

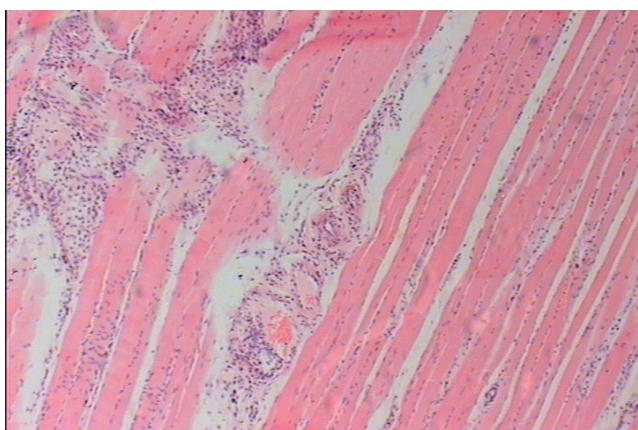


Рисунок 12 – Отек интерстиции, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции

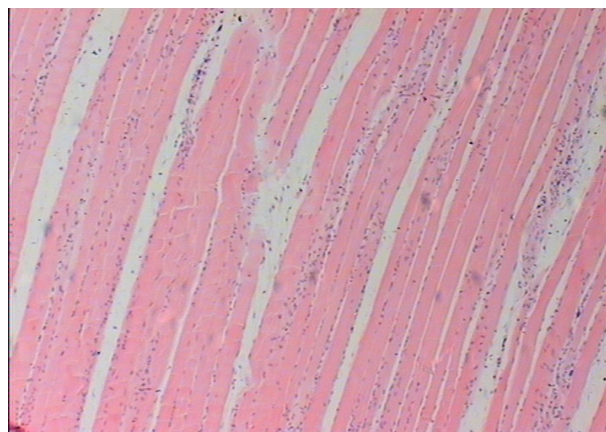


Рисунок 13 – Слабые пролифераты в интерстиции мышцы

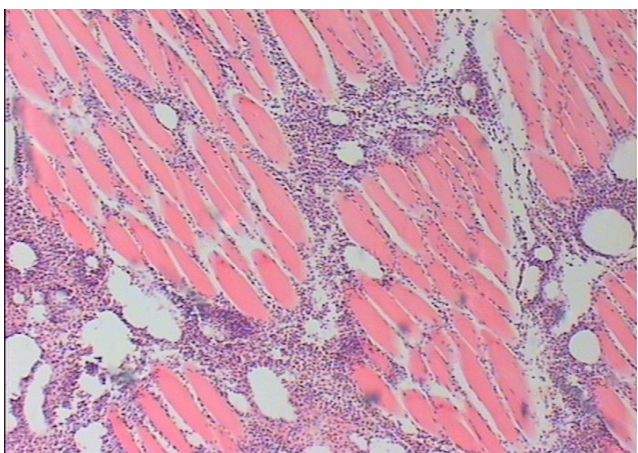


Рисунок 14 – Крупные пролифераты в интерстиции мышцы и на месте некротизированных мышечных волокон

на 7 сутки опыта

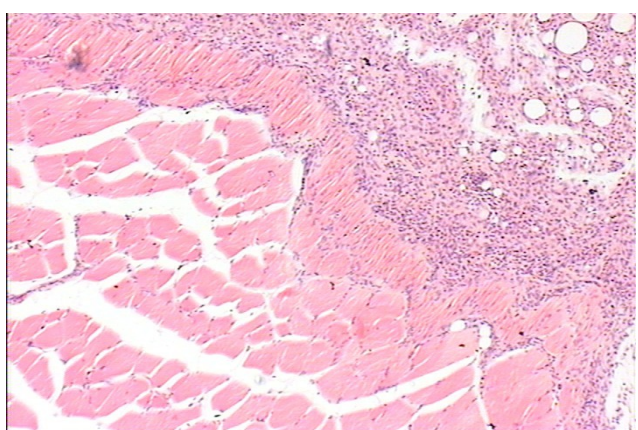


Рисунок 15 – Отек интерстиции, умеренная пролиферация лимфоидно-макрофагальных клеток и разрастание соединительной ткани в интерстиции

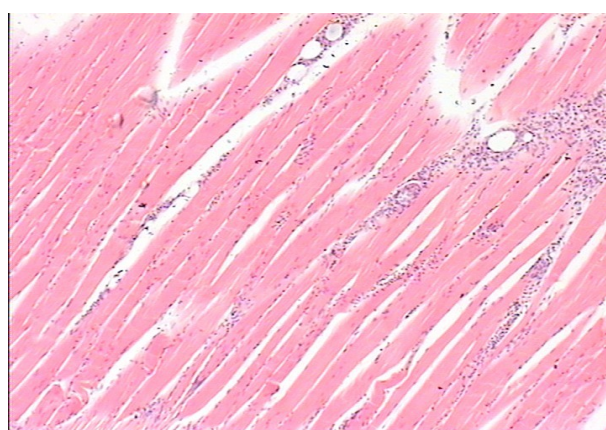


Рисунок 16 – Слабые пролифераты в интерстиции мышцы

Тканевая реакция у крыс на месте введения вакцины с адьювантом Эмульсиген 10%

через 3 суток после введения вакцины

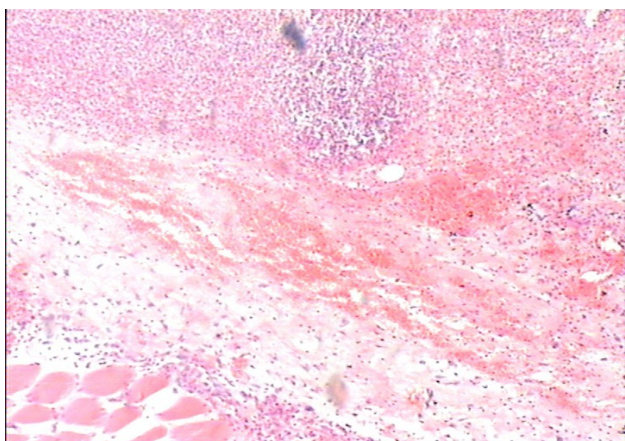


Рисунок 20 – Некроз мышечных волокон, формирование демаркационного вала, очаговая пролиферация лимфоидных клеток

на 7 сутки опыта

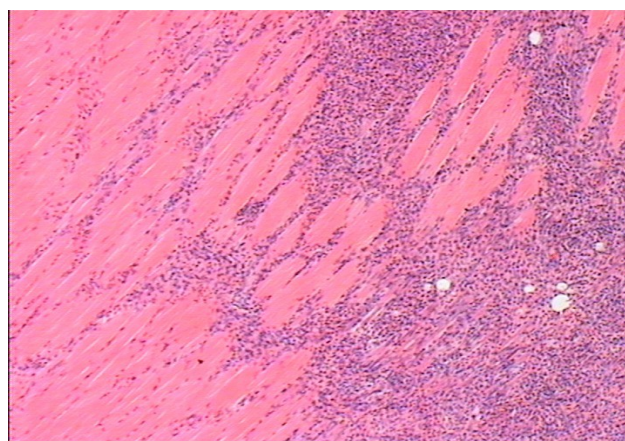


Рисунок 21 – Некроз мышечных волокон. Интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита

Через 3 суток после введения антигенов инактивированного вируса инфекционного ринотрахеита и возбудителя протейной инфекции с адьювантом *Эмульсиген* на месте введения отмечается некроз мышечных волокон, формирование демаркационного вала, очаговая пролиферация лимфоидных клеток, а через 7 суток – некроз мышечных волокон,

интенсивная пролиферация лимфоидных клеток на месте некротического детрита.

Следующим этапом исследований явилось изучение формирования гуморального иммунного ответа у животных после введения инактивированного вируса инфекционного ринотрахеита и возбудителя протейной инфекции с различными адьювантами.

Таблица – Титр антител к вирусу ИРТ и *Proteus mirabilis* после вакцинации инактивированной вакциной, \log_2

| № группы | Адьювант | Вирусу ИРТ | | <i>Proteus mirabilis</i> | |
|----------|--------------------|------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | | 14 день | 28 день | 14 день | 28 день |
| 1 | Эмульсиген 10% | 4±0,21 | 7±0,1,2** | 6,0±0,0* | 6,0±0,0* |
| 2 | Montanide ISA 15 | 4±0,36 | 7±0,9** | 7,5±0,5* | 7,0±0,0** |
| 3 | Montanide ISA 70 | 4±0,21 | 4±0,4,8 | 5,0±0,0 | 7,0±0,0** |
| 4 | Montanide ISA 206 | 5±0,42* | 6±0,72* | 5,0±0,0 | 8,0±1,0** |
| 5 | Без адьювантов | 3±0,12 | 4±0,21 | 7,0±0,0* | 5,0±1,0* |
| 6 | Не вакцинированные | 3±0,12 | 3±0,12 | 2,0±0,0* | 2,2±0,0* |

Как видно из таблицы, наибольший титр антител к *Proteus mirabilis* на 14 день после введения вакцины отмечается при использовании в качестве адьюванта *Montanide ISA 15*. На 28 сутки после введения наилучшие результаты отмечены при использовании в качестве адьюванта *Montanide ISA 206*. Наименьший уровень выработки антител при введении вакцины к бактериальному компоненту на 14 сутки отмечен при использовании

в качестве адьювантов *Montanide ISA 70* и *Montanide ISA 206*, на 28 сутки – *Эмульсигена 10%*.

При оценке уровня выработки антител при введении вакцины к вирусному компоненту наиболее высокие показатели установлены на 14 сутки при использовании адьюванта *Montanide ISA 206*. На 28 сутки наибольшая выработка антител отмечена при использовании вакцины с *Montanide ISA 15* и

Эмульсигена 10%, а наименьшая – после введения вакцины с использованием *Montanide ISA 70*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что при использовании масляных адъювантов *Montanide ISA 70*, *Montanide ISA 15*, *Montanide ISA 206* и *Эмульсиген 10%* на месте введения имеются существенные изменения. Это особенно отмечает-

ся при использовании адъювантов *Эмульсиген 10%*, *Montanide ISA 15*, *Montanide ISA 206*. При этом в мышечной ткани отмечают наличие небольшого количества некротизированных клеток и интенсивной пролиферации лимфоидных клеток на месте введения. Это подтверждается и уровнем выработки антител у животных, где была минимальная некротизация тканей и максимальная пролиферация лимфоидных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1 Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник для студентов высш. уч. Заведений/Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колосс, 2006. – 432с.

2 Красочко, П. А. Изучение антигенных свойств компонентов вакцины против вирусной диареи, клебсиеллеза, ротавирусной и протейной инфекций крупного рогатого скота с различными адъювантами/ П.А. Красочко [и др.]// Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов / Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти. – Щелково, 2009. – С. 253 – 260.

3 Красочко, П.А Изучение иммунного ответа у животных после введения инактивированных вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, рота- и короновирусной инфекций крупного рогатого скота с различными адъювантами / П.А Красочко, С.В. Бойчук // Ветеринарная патология. – 2005. – № 2.– С. 54 – 55.

4 Красочко, П. А. Подбор оптимальных адъювантов при конструировании ассоциированной инактивированной вакцины против ротавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота [Текст] / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сборник научных трудов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, Учреждение образования "Белорусская государственная сельскохозяйственная академия". – Горки, 2011. – Вып. 14,

ч. 2. – С. 244 – 249.

5 Мамков, Н. С. Оценка реактогенности компонентов эмульсионных вакцин на белых мышах/ Н. С. Мамков [и др.] // Акт. пробл. вет. вирусол.: тез. докл. научн. конф. посвящен. 30-летию ВНИИИ. – Владимир, 1988. – Ч. 2. – С. 31 – 33.

6 Самуйленко, А. Я. Оценка реактогенности эмульгаторов в составе эмульсионных вакцин на морских свинках / А. Я. Самуйленко [и др.] // Научн. основы технологии пром. пр-ва вет. биол. препаратов: тез. докл. третьей Всесоюз. конф. – М., 1987. – С. 34 – 35.

7 Селиверстов, А.В. Сравнительная оценка масляных адъювантов в составе вакцины против инфекционной бурсальной болезни/ А.В. Селиверстов [и др.]// Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010.– Т. 8. – С. 155–169.

8 Шемельков, Е.В. Влияние разных адъювантов на эффективность вакцин ПЛАР и ПЛА / Е.В.Шемельков [и др.]// Ветеринария.– 2009.– № 11.– С. 23 – 28.

9 Droual, R. Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens / R. Droual, A. A. Bickford, B. R. Charlton [et al.] // Avian Diseases. – 1990. – Vol. 34. – № 2. – P. 473 – 478.

10 Lima, K. M. Vaccine adjuvant: it makes difference/ K. M. Lima, S. Aparecida dos Santos, J. M. Rodrigues [et al.] // Vaccine. – 2004. – Vol. 22, №19. – P. 2374 – 2379.

ПРИМАНКА ВАКЦИНОСОДЕРЖАЩАЯ АНТИРАБИЧЕСКАЯ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ

- ⇒ применяется в осенне-зимний и зимне-весенний периоды: образцы раскладываются в местах обитания животных в количестве из расчета 15–20 штук на 1 км²;
- ⇒ в течение 25–30 суток после поедания вызывает у животных выработку иммунитета к бешенству, который сохраняется до 1 года.

