

## **АДЬЮВАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТИВОВИРУСНЫХ ВАКЦИН**

А.И. АЛБУЛОВ<sup>1</sup>, М.А. ФРОЛОВА<sup>1</sup>, В.П. ВАРЛАМОВ<sup>1</sup>, А.В. ГРИНЬ<sup>1</sup>,  
Ж.Ю. МУРАДЯН<sup>1</sup>, П.П. КРАСОЧКО<sup>2</sup>, В.П. КРАСОЧКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, РФ

<sup>2</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, РБ

*Поступила в редакцию 09.06.2015 г.*

### **ВВЕДЕНИЕ**

В последние годы наблюдается возрастание интереса исследователей различных стран к использованию хитозана при конструировании вакцин. При этом хитозан используется как в качестве сорбента антигена, так и стимулятора поствакцинального иммунного ответа (1, 2). Ряд работ выполнен по включению модификаторов хитозана в качестве адьюванта в вакцины против листериоза, псевдомоноза, бруцеллеза, туберкулеза, ящура, гриппа и других инфекций (3–5). Имеется опыт успешного включения нанохитозана для повышения иммунного ответа при конструировании бруцеллезных вакцин (6).

Целью настоящих исследований является изучение адьювантных свойств различных модификаций хитозана на модели инактивированной вакцины против ротавирусной инфекции, колибактериоза и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Накопление ротавирусов проводили на культуре клеток СПЭВ в среде Игла до титра 7,0 lg ТЦД 50/мл эшерихии культивировали на мясопептонном агаре до титра микробных тел 5млрд/мл. После инактивирования теотропином в культуральные жидкости с антигеном вносили хитозан различных препаративных форм до конечной концентрации 0,25%, тщательно перемешивали и вводили внутримышечно белым крысам в дозе 0,5 мл. Через 7 дней животных totally обескровливали и в сыворотке крови определяли наличие антигел к ротавирусу в РНГА, к эшерихиям – в РА. Для контроля использовали алюмокалиевые квасцы в общепринятой концентрации.

Накопление вируса инфекционного ринотрахеита проводили на культуре клеток МДБК с использованием роллерного культивирования. В работе использовали штамм «КМИЭВ-V123» с инфекционной активностью 6,5 lg ТЦД 50/мл. Инактивацию вируса проводили с помощью теотропина в 0,2% концентрации. Иммунный ответ на введение вируса ИРТ изучали на телятах (45 голов) по 5 телят в группе. В качестве иммуностимулятора ис-

пользовали полиоксидоний, гидроокись алюминия, сапонин, эмульсиген, Мантанид Иза 15, хитозана сукцинат, которые вводили совместно с инактивированным вирусом ИРТ двукратно с интервалом в 21 день в объеме 1,0 мл в различных дозах и концентрациях. Контрольной группе животных инактивированный вирус ИРТ не вводили. Кровь у животных брали до иммунизации, через 14 и 45 дней после иммунизации.

Наличие антител к вирусу ИРТ определяли в РНГА с использованием эритроцитарных диагностикумов. РНГА ставили путем разведения исследуемых сывороток крови в растворителе микротитраторе системы Такачи в объеме 0,025 мл в разведениях от 1:2 до 1:256. Положительной считали реакцию при титре исследуемой сыворотки 1:16 и выше при агглютинации жидкого эритроцитарного антигена на 4+ – 2+.

В опытах использовали препараты хитозана производства ВНИТИБП-ЗАО «Биопрогресс» (г. Щелково Московской области): хитозан высокомолекулярный и низкомолекулярный, сукцинат и глутамат хитозана.

Исследования проведены в условиях РУП «Института экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии, УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проверка адьювантных свойств различных модификаций хитозана на модели инактивированной вакцины против ротавирусной инфекции показала, что наибольшей активностью по отношению к ротавирусу обладают хитозан низкомолекулярный и глутамат хитозана (титры антител к вирусу после иммунизации составили 1:16).

Титры антител к *E. coli* после использования в составе колибактериозной вакцины различных хитозановых адьювантов были самыми высокими с сукцинатом хитозана и низкомолекулярным хитозаном.

Алюмокалиевые квасцы показали низкую адьювантную активность к вирусному антигену и высокую к бактериальному, однако сильная местная воспалительная реакция, образование язв и некрозов делают их применение нецелесообразным. До иммунизации у крыс титр антител к ротавирусу и эшерихиам отсутствовал (таблица 1).

Изучение титров антител вируса ИРТ в опытах на телятах при использовании различных адьювантов показало, что наиболее эффективными адьювантами являются сукцинат хитозана и Иза-15 (уровень поствакцинальных антител к вирусу ИРТ до  $5,33 \log_2$ ).

Таблица 1 – Титры антител к ротавирусу и эшерихиям у крыс после использования различных адьювантов

№ п/п	Адьювант	Титр антител		
		к ротавирусу	к E-coli K 88	к E-coli A 20
1	хитозан глутамат	1:16	1:32	1:64
2	хитозан сукцинат	1:8	1:32	1:128
3	хитозан высокомолекулярный (ММ 495 кДа, СДА 81%)	1:8	1:32	1:32
4	хитозан низкомолекулярный (ММ 80 кДа, СДА 87%)	1:16	1:128	1:256
5	алюмокалиевые квасцы	1:4	1:64	1:128
6	без адьюванта	1:8	1:8	1:2

Таблица 2 – Титры антител к вирусу инфекционного ринотрахеита у телят после использования различных адьювантов

До иммунизации	Через 14 дней	Через 45 дней
1-е взятие крови (перед иммунизацией)	2-е взятие крови (вторая иммунизация)	3-е взятие крови (14 дней после второй иммунизации)
опытная группа 1 полиоксидоний 250 мкг		
3±0	3,6±0,33	3,6±0,33
опытная группа 2 полиоксидоний 500 мкг		
4,33±0,33	5±0,58	4,67±0,67
опытная группа 3 гидроксал 0,6%		
3,67±0,33	4,33±0,33	5±1,00
опытная группа 4 гидроксал + сапонин		
3,33±0,33	4,33±0,67	4,67±0,88
опытная группа 5 10% эмульсиген		
3,5±0,29	4,25±0,25	4,5±0,5
опытная группа 6 Иза 15		
3,75±0,48	4,5±0,5	6±0,41
опытная группа 7 хитозана сукцинат 0,5%		
3,33±0,33	3,67±0,33	5,33±0,33
опытная группа 8 хитозана сукцинат 0,25%		
3±0	4,67±0,33	4,33±0,67
опытная группа 9 вирус ИРТ без адьюванта		
4±0,41	4,5±0,50	5±0
контроль		
3±0,57	3±0	3,3±0,33

Высокий уровень антител был определен при использовании гидроксала (до  $5,0 \log_2$ ). Однако использование гидроксала с сапонином, полиоксидонием (500 мкг/голову) и 10% эмульсигеном позволило повысить уровень антител только до  $4,67 \log_2$  и  $4,5 \log_2$  соответственно, а с полиоксидонием (250 мкг/голову) – до  $3,6 \log_2$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о преимущественном использовании различных препаративных форм хитозана в качестве адъюванта при изготовлении противовирусных и антибактериальных вакцин по сравнению с известными адъювантами.

## ЛИТЕРАТУРА

1 Закутский, Н.И. Применение новой инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита КРС / Н.И. Закутский, В.И. Жестерев, И.Р. Вишняков [и др.] // «Вестник Рос. Академии с.-х. наук. – 1999. – № 5. – С. 66–68.

2 Албулов, А.И. Перспективы использования хитозана в производстве вакцин / А.И. Албулов, А.Я. Самуйленко, В.П. Варламов [и др.]. // Матер. Междунаучно-практич. конференции «Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства». Алматы. – 2012. – С. 62–67.

3 Okawa, Y., Kobayashi, M., Suzuki, M. Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* infections in mice / Biol Pharm Bull. 2003. yun. – 26(6). – P. 902–904.

4 Chang, N. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5 N1 vaccine DNA / N. Chang, X. Li, Y. Liang, B. Peng, F. Fang, Z. Chen, //Cell Biol. – 2010. – V. 29. – P. 563–569.

5 Маркушин, С.Г. Сравнительное изучение адъювантных свойств различных форм хитозана при мукозальной вакцинации живой и инактивированной гриппозными вакцинами / С.Г. Маркушин, А.Д. Переверзев, И.Б. Котляева, Г.Г. Кривцов, А.С. Сухно // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2010. – №5. – С.82–85.

6 Allison, C. Rice-Ficht Good or Bad Brucella Vaccine: It's All in the Delivery Brucellosis / Jnt. Research. Con. – 2011. – P.15.