

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-5-5
УДК 578.74

Эффективность применения адьюванта и иммуномодулирующих препаратов при иммунизации животных вирусом бешенства



Клюкина В.И.
Klukina V.I.

Клюкина В.И., доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии
Федоров Ю.Н., член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии
Богомолова О.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии
Анисина О.В., кандидат биологических наук, заведующая отделом производственной санитарии
Романенко М.Н., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии
Святенко М.С., научный сотрудник отдела иммунологии, **Устинова В.А.**, аспирант
ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", п. Биокомбината, vnitibp@mail.ru

Ключевые слова: иммуномодулятор, масляный адьювант, вирус бешенства, антирабическая сыворотка, антитела.

Резюме. В статье представлены сравнительные результаты применения иммуномодулирующих препаратов "Имунофан" и "Полиоксидоний" и адьюванта на основе синтетического масла ПЭС-300 с ланолином при иммунизации баранов очищенным инактивированным вирусом бешенства. Эффект повышения уровня специфических антител у иммунизированных животных достоверно возрастает при сочетанном применении этих иммуномодуляторов с вирусом бешенства и масляным адьювантом. Показаны преимущества препарата "Имунофан", введение которого с эмульгированным вирусом бешенства обеспечивало формирование более высокого уровня антирабического иммунитета. Сочетанное использование вируса бешенства с масляным адьювантом и препаратом "Имунофан" может быть рекомендовано для получения антирабической сыворотки, как компонента диагностических тест-систем.

Введение

В последние годы существенно возрос интерес исследователей к использованию иммуномодулирующих препаратов (ИМ) для повышения общей резистентности организма животных ко многим возбудителям инфекционных болезней [1]. Кроме того, ИМ могут использоваться в сочетании с инактивированными вакцинами в профилактике инфекционных болезней животных и людей, а также в технологии приготовления гипериммунных лечебных и диагностических сывороток [4, 7]. Для иммунодиагностики бешенства методом флюоресцирующих антител (МФА), "сэнд-

The effectiveness of the use of adjuvant and immunomodulatory drugs for immunization of animals with rabies virus

Klukina V.I., Fedorov Yu.N., Bogomolova O.A., Anisina O.V., Romanenko M.N., Svytenko M.S., Ustinova V.A.

Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Technological Institute of Biological Industry" Ministry of Education

Key words: immunomodulator, oil adjuvant, rabies virus, rabies serum, antibodies.

Abstract. The article presents the comparative results of the use of immunomodulatory preparations Immunofan and Polyoxidonium and an adjuvant based on synthetic oil PES-300 with lanolin during the immunization of sheep with purified inactivated rabies virus. The effect of increasing the level of specific antibodies in immunized animals significantly increases with the combined use of these immunomodulators with rabies virus and oil adjuvant. The advantages of the Immunofan preparation are shown, the introduction of which with rabies virus emulsified virus ensured the formation of a higher level of rabies immunity. The combined use of rabies virus with oil adjuvant and Immunofan can be recommended for obtaining anti-rabies serum, as a component of diagnostic test systems.

вич"-вариантом иммуноферментного анализа (ИФА), иммуногистохимии (ИГХ) и иммунохроматографии (ИХА) необходимы антирабические сыворотки с высоким титром преципитирующих и комплементсвязывающих антител против главных штамма и видо-специфических антигенных детерминант нуклеопротеина (НК) вируса бешенства. Тесты, предназначенные для выявления антирабических антител, базируются на применении референс-сывороток с высокой активностью вируснейтрализующих антител к гликопротеину G вируса бешенства [8].

Низкая иммуногенность инактивированного рабического материала, и многократное его введение в возрастающих дозах, является основными недостатками изготовления гипериммунной антирабической сыворотки. Методология приготовления высокоактивной гипериммунной антирабической сыворотки включает поиск эффективных адьювантов и иммунокорректирующих средств, использование которых позволит повысить иммуногенность инактивированного рабического антигена, эффективно управлять иммунным ответом, избирательно воздействуя на лимфоциты и формируя Th1, Th2 и цитотоксический Т-клеточный иммунный ответ [5,6].

Цель исследования заключалась в сравнительном изучении эффективности препаратов "Имунофан" и "Полиоксидоний" при сочетанном их применении для иммунизации животных вирусом бешенства с масляным адьювантом.

Материалы и методы

Животные. Продукентами антирабической сыворотки служили бараны 3–4 месячного возраста. Все работы с животными проводили строго по "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных".

Вирус бешенства. Препарат очищенного и инактивированного вируса бешенства получали путем инактивации 0,025% β-пропиолактоном ("Sigma", США) вируссодержащей суспензии ткани мозга баранов, павших после интрацеребрального заражения фиксированным вирусом бешенства производственного штамма "Овечий-ВГНКИ", и центрифугирования при 5 тыс/об/мин в течение 30 мин и при 36 тыс. об/мин в течение 90 минут.

Препараты. В качестве адьюванта использовали по-

Для цитирования / For citation

Эффективность применения адьюванта и иммуномодулирующих препаратов при иммунизации животных вирусом бешенства / Клюкина В.И. [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - №5 - С. 17-18
The effectiveness of the use of adjuvant and immunomodulatory drugs for immunization of animals with rabies virus / Klukina V.I. [et. al.] // Veterinaria i kormlenie. - 2019. - №5 - P. 17-18

лизилисилоксановую жидкость ПЭС-300 и ланолин (Россия). Для иммунизации баранов очищенный вирус бешенства диспергировали с ПЭС-300 + ланолин 1:1 (объем/объем) на аппарате Labo-Moderne TP 13/2 при частоте 20 кГц до получения стабильной эмульсии. Препараты "Иммунофан" и "Полиооксидоний" (Россия) вводили животным в дозировках в соответствии с рекомендациями фирм-производителей на 1кг массы животных.

Иммуностимулирующее действие препаратов изучали в опытах по иммунизации 2-х групп (n=4) баранов, которым внутримышечно (в/м) с интервалом 7 дней вводили эмульгированный вирус бешенства по 12 см³ в паховую область с одновременной внутримышечной инъекцией 1,0 см³ одного из иммуномодулирующих препаратов. Животным контрольной группы вводили внутримышечно только эмульгированный вирус бешенства. На 35, 49, 63 дни от начала иммунизации (срок наблюдения) у всех животных брали кровь, отделяли сыворотку и оценивали эффективность иммуномодулирующих препаратов по уровню антител, определенных в реакции диффузионной преципитации (РДП) с компонентами "Набор компонентов для диагностики бешенства в реакции диффузионной преципитации" ТУ 9388-006-0049763-99 серия № 3 (ФГБНУ ВНИИТИБП) и в реакции связывания компонента (РСК) [3]. Вируснейтрализующую активность (МЕ/см³) исследуемых сывороток определяли в тесте протективной защиты на мышах (РН) относительно вируса бешенства штамм "CVS" и референс-сыворотки антирабической сухой № 1 (сер.СА-03) с активностью 20 МЕ/см³ [2]. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами.

Результаты исследований и обсуждение

Первичная оценка адьювантных свойств полиэтилсилоксановой жидкости ПЭС-300 и ланолина проведена в серии опытов по иммунизации овец инактивированным вирусом бешенства, эмульгированным с ПЭС-300 и ланолином. Подкожное 5-ти кратное с интервалом 7 дней введение животным эмульгированного вируса бешенства позволило получить антирабическую сыворотку с титром комплементсвязывающих антител в РСК 1:160, преципитирующих антител в РДП -1:64-1:128 [5]. В данных исследованиях оценивали эффективность внутримышечного введения эмульгированного с ПЭС-300 и ланолином вируса бешенства и сочетанного применения иммуномодуляторов на выработку в сыворотке крови иммунизированных баранов преципитирующих, комплементсвязывающих и вируснейтрализующих антител (таблица 1).

Из таблицы 1 следует, что изучаемые ИМ препараты оказывали иммуностимулирующее влияние на формирование антирабического специфического иммунитета при сочетанном внутримышечном введении эмульгированного с ПЭС-300+ланолин вируса бешенства штамм "Овечий-ВГНКИ". У животных 2-ой группы, иммунизированных эмульгированным вирусом бешенства сочетано с препаратом "Иммунофан" к 35 дню иммунизации средние геометрические значения обратных титров преципитирующих антител в РДП увеличился в 6,2 раза, комплементсвязывающих в РСК в 4 раза; к 49 дню преципитирующих антител в 4 раза, комплементсвязывающих в 3,7 раза по сравнению с контрольной группой. У животных 3-группы после введения препарата "Полиооксидоний" в комбинации с эмульгированным вирусом бешенства приrost титров преципитирующих

и комплементсвязывающих антител был ниже – в 2,6 и 2,2 раза соответственно. В более поздние сроки к 63 дню иммунизации высокие титры антител в сыворотке крови животных 2 и 3 групп сохранялись на более высоком уровне. Под влиянием введения иммуномодуляторов также достоверно увеличивалась протективная активностью сывороток с 8,75±2,5 МЕ/см³ до 18,75±2,5 МЕ/см³ у животных 2 группы, с 7,5 ±2,9 до 17,5 ±2,9 у животных 3 группы, в сравнение с контролем – 4,5±0,5 и 5,0 ±1,1 МЕ/см³.

Таким образом, "Иммунофан" оказался более активным препаратом при сочетанном его применении с вирусом бешенства, эмульгированном в ПЭС-300 с ланолином по сравнению с препаратом "Полиооксидоний".

Заключение

Суммируя полученные данные, можно отметить эффективность применения препаратов "Иммунофан" и "Полиооксидоний" и адьюванта, способствующих значительному повышению титров специфических антирабических антител в сыворотке крови животных-продуцентов за счет стимулирования антителообразования. Максимальный иммуностимулирующий эффект в наших опытах был получен при внутримышечном введении инактивированного вируса бешенства с адьювантом на основе ПЭС-300 и ланолин с одновременным введением препарата "Иммунофан". Полученные результаты дают основания включения их в технологию приготовления высокоактивной гипериммунной антирабической сыворотки, пригодной для производства препаратов для диагностики бешенства животных.

Литература

1. Адьюванты / Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Еремец В.И. и др. - М.: ВНИИТИБП, 2016. - 171 с.
2. ГОСТ СССР 26075-84. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. - М.: Государственный комитет СССР по стандартам, 1984. - 12 с.
3. Методы лабораторных исследований по бешенству. Под ред. М.Каплан, Н.Корговски. // Женева: ВОЗ. - 1975. - 358 с.
4. Пинегин, Б.В. Полиоксидоний: новые аспекты применения / Б.В. Пинегин, А.В. Некрасов, Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление. - 2004. - №3(3). - С. 41-47.
5. Патент № 2609766 Российская Федерация, МПК C12P 21/00 (2006.01), A61K 39/205 (2006.01), A61P 31/12 (2006.01) Способ получения антирабической диагностической сыворотки / Клюкина В.И., Анисина О.В., Богомолова О.А., Романенко М.Н., Федоров Ю.Н.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВНИИТИБП. - №2015147814 заявл. 09.11.15; опубл. 02.02.17, Бюл. № 4. - 8 с.
6. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент РФ 2322503 C12P21/00, A61K39/42, C07K16/08, A61P31/12 от 21.07.2006.
7. Фармакология иммунокорректоров. В.В. Юшков, Т.А. Юшкова, А.С. Ларионов. Екатеринбург, 2005. - 163 с.
8. Rabies (infection with rabies virus). Chapter 2.1.17. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Vol.2. Paris: World Organisation for Animal Health; 2017.
9. Ad'yuvanty / Samujlenko A.YA., Grin' S.A., Eremec V.I. i dr. - M.: VNIITIBP, 2016. - 171 s.
10. GOST SSSR 26075-84. Zhivotnyye sel'skhozayajstvennyye. Metody laboratornoj diagnostiki beshenstva. - M.: Gosudarstvennyj komitet SSSR po standartam, 1984. - 12 s.
11. Metody laboratornyh issledovanij po beshenstvu. Pod red. M.Kaplan, N.Koprowski. // Zheneva: VOZ. - 1975. - 358 s.
12. Pinegin, B.V. Polioksidoni: novye aspekty primeneniya / B.V. Pi-negin, A.V. Nekrasov, R.M. Haitov // Citokiny i vospalenie. - 2004. - №3 (3). - S. 41-47.
13. Patent № 2609766 Rossijskaya Federaciya, MPK C12P21/00 (2006.01), A61K 39/205 (2006.01), A61P 31/12 (2006.01) Sposob po-lucheniya antirabicheskoj diagnosticheskoj syvorotki / Klyukina V.I., Anisina O.V., Bogomolova O.A., Romanenko M.N., Fedorov YU.N.; zayavitel' i patentoobladatel' FGBNU VNIITIBP. - №2015147814 zayavl. 09.11.15; opubl. 02.02.17, Byul. № 4. - 8 s.
14. Sposob polucheniya vysokospetsifichnoj geterologichnoj antirabicheskoj syvorotki. Patent RF 2322503 C12P21/00, A61K39/42, C07K16/08, A61P31/12 ot 21.07.2006.
15. Farmakologiya immunokorrektorov. V.V. Yushkov, T.A. Yushkova, A.S. Lariонов. Ekaterinburg, 2005. - 163 s.
16. Rabies (infection with rabies virus). Chapter 2.1.17. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Vol.2. Paris: World Organisation for Animal Health; 2017.

Таблица 1. Влияние иммуномодуляторов на выработку антирабических антител в процессе иммунизации
Table 1. The effect of immunomodulators on the production of rabies antibodies in the immunization process.

№ группы	Препарат	Метод исследования сывороток	Дни взятия крови/ средние геометрические значения титров (M±m)		
			35	49	63
1	Вирус бешенства ПЭС-300+ланолин (контроль)	РДП	9,0 ±1,7	48±5,3	96 ±28
		РСК	17,5±4,3	38 ±8,6	38 ±8,6
		РН	4,5±0,57	4,75 ±0,5	5,0 ±1,1
2	Вирус бешенства ПЭС-300+ланолин «Иммунофан»	РДП	56,0 ±1,8	192±32	384±42
		РСК	70 ±17,3	140±34,6	240±80
		РН	8,75 ±2,5	12,5 ±2,9	18,75 ±2,5
3	Вирус бешенства ПЭС-300+ланолин «Полиооксидоний»	РДП	24,0 ±2,3	112±32	224±64
		РСК	38,0 ±8,6	180 ±28,4	240 ±80
		РН	7,5 ±2,9	11,25 ±2,5	17,5 ±2,9