

УДК: 619:616.98:578.831.11:578.834.11:578.826:615.371

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИГЕНОВ В ЭМУЛЬСИОННЫХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН

Рунина И. А., Волкова М. А., Семченко И. А., Ушакова А. Н.,
Мудрак Н. С., Борисов В. В., Дрыгин В. В., Зуев Ю. В.

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», ФГУ «ВНИИЗЖ»,
г. Владимир, Россия

Резюме. Показана возможность использования изопропилмеристата для выделения водной фазы из эмульсионных вакцин.

Установлено наличие корреляции между содержанием антигена в водной фазе эмульсионных вакцин и титром антител в сыворотках крови кур после их иммунизации. Определена активность антигенов в составе биопрепаратов при хранении.

Ключевые слова: эмульсионная вакцина, изопропилмеристат, водная фаза, активность антигена.

Summary. The possibility of using isopropyl myristate for isolation water phase of killed emulsion vaccine was showed. The level of correlations between the concentration of antigen in the water phase killed emulsion vaccine and antibodies level in the blood serum of chickens after their immunization was determined. The antigen concentration in the water phase of killed emulsion vaccine during the storage was showed.

Key words: emulsion vaccine, isopropyl myristate, water phase, antigen concentration.

Введение

Вакцинопрофилактика широко применяется в промышленном птицеводстве для обеспечения стойкого эпизоотического благополучия по инфекционным болезням птиц. В связи с этим, большое значение имеет оценка качества вакцинных препаратов. Для количественной оценки содержания антигена в исходном вируссодержащем материале широко используется реакция гемагглютинации (для вирусов ньюкаслской болезни, синдрома снижения яйценоскости-76) и блокирующий вариант ИФА [4].

Для оценки иммуногенной активности и протективных свойств вакцин проводят эксперименты по вакцинации на естественно-восприимчивых животных, с последующим контрольным заражением [3]. В настоящее время большой интерес представляют эксперименты по оценке корреляции между содержанием антигена в исходном материале и уровнем антител в сыворотках крови кур в ответ на его введение. Эти

исследования позволяют рассматривать метод количественной оценки содержания антигена в вакцинах *in vitro* как альтернативу существующему *in vivo* методу определения иммуногенности вакцин, что существенно снижает затраты на проведения экспериментов и сокращает время проведения исследований [3].

Оценка антигенной активности инактивированных вакцин, представляющих собой водно-масляную эмульсию обратного типа («вода/масло») представляет определенную сложность. Для исследования этих препаратов необходимо предварительное разделение их на водную и эмульсионную фракции. При этом большое значение имеет выбор метода, обеспечивающего наиболее полное выделение водной фазы, содержащей антиген, без его разрушения [5,6].

Целью наших исследований являлся выбор оптимального способа выделения водной фазы для определения содержания антигена в инактивированных вакцинах и оценки корреляции между количеством специфического компонента, определенным *in vitro* и серологическим ответом после вакцинации *in vivo*.

Материалы и методы

Вакцины. В работе использовали коммерческие серии вакцин производства ФГУ «ВНИИЗЖ» (моно-, и ассоциированные) против НБ, ИБК, ССЯ-76 и лабораторные образцы эмульсионных вакцин. Лабораторные образцы вакцин (моно-, двух- и трёхвалентные) формировали из инактивированных вирусов НБ с титром в Б-ИФА – 1:512; ИБК с титром в Б-ИФА 1:16 и ССЯ-76 с титром в С-ИФА - 1:6400. В качестве масляного адьюванта для приготовления вакцин был использован Montanide ISA 70 (SEPPIC, Франция). Антиген смешивали с адьювантом в соотношении 30:70 (объём/объём), соответственно.

Выделение антигена из масляных вакцин. Образец эмульсионной вакцины в объёме 3 мл смешивали с 24 мл изопропилмиристата (Sigma, Швеция) или 6 мл хлороформа (Sigma, Швеция) на минишейкере в течение 2 мин при 2500 об/мин. После центрифугирования смеси при 2500 об/мин (1000g) в течение 10 мин отбирали водную фазу и определяли содержание антигена в пробе.

Блокирующий вариант ИФА (Б-ИФА). Постановку реакций Б-ИФА проводили в соответствии с методиками (1). При постановке реакций использовали в качестве положительного контроля антигены вируса НБ (титр в РГА $8 \log_2$, в Б-ИФА – 1:1024) и вируса ИБК (титр в Б-ИФА 1:64), в качестве отрицательного контроля - аллантоисную жидкость эмбрионов СПФ-кур; в качестве блокирующих антител - фракции иммуноглобулинов (IgG) кролика на фрагмент белка S2 вируса ИБК и специфические к вирусу НБ IgG кролика; коммерческий антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против IgG кролика (ВНИИЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва), неионный детергент NP 40 (Sigma, США).

Непрямой «сэндвич»-вариант ИФА. Постановку реакции «сэндвич»-варианта ИФА (С-ИФА) проводили в соответствии с методикой [1]. В качестве специфических компонентов реакции использовали

очищенный концентрированный препарат антигена вируса ССЯ-76 с титром в С-ИФА 1:6400 (положительный контроль), специфические к вирусу ССЯ-76 IgG кролика (улавливающие антитела), специфические к вирусу ССЯ-76 IgG морской свинки (детекторные антитела), нормальную аллантоисную жидкость утиных эмбрионов (отрицательный контроль); в качестве антивидового конъюгата использовали коммерческий препарат антител кролика против Ig G морской свинки, конъюгированный с пероксидазой хрена (ВНИИЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Реакция гемагглютинации. Постановку реакции гемагглютинации (РГА) проводили по стандартной методике [1].

Постановка эксперимента по вакцинации цыплят. Формировали девять групп 60-суточных цыплят по 10 голов в каждой. Цыплятам восьми однократно вводили инактивированную эмульсионную вакцину внутримышечно, в объеме 0,5 мл/голову. Девятая группа цыплят оставалась неиммунизированной и использовалась в качестве контроля. Пробы сывороток для исследований отбирали через 28 суток после иммунизации.

Результаты и обсуждение

Выбор оптимального способа выделения водной фазы из эмульгированных инактивированных вакцин. Было проведено сравнение концентрации антигенов вирусов ССЯ-76, НБ и ИБК в водных фазах лабораторных образцов вакцин, выделенных разными способами, относительно их исходных титров.

Результаты исследования моновалентных вакцин представлены на рис. 1.

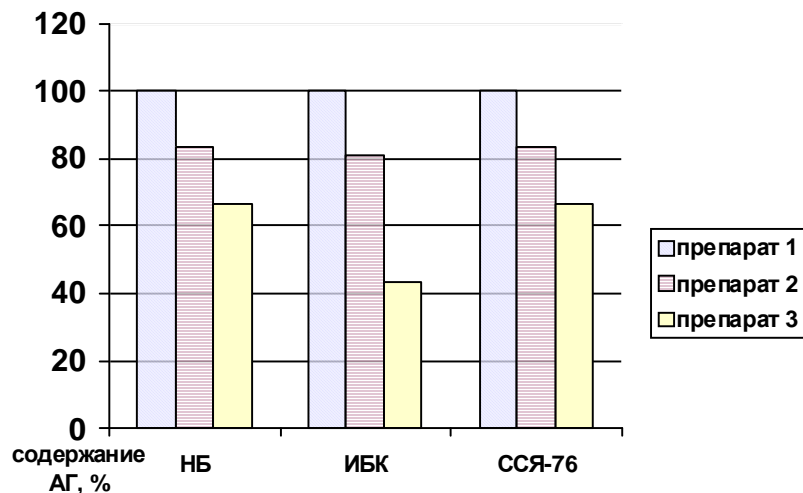


Рис.1. Относительное содержание антигенов вирусов ССЯ-76, НБ и ИБК в водной фазе, выделенной из образцов вакцин с помощью изопропилмеристата (препарат 2) и хлороформа (препарат 3), по сравнению с исходными титрами антигенов (препарат 1).

Из полученных в ходе экспериментов данных видно, что содержание антигенов в водной фазе образцов моновалентных эмульсионных вакцин после выделения с помощью изопропилмеристата составляло: для НБ –

83,3%, ИБК – 81,2% и ССЯ-76 – 83,3 % от исходного значения. Эти результаты значительно отличались от данных, полученных при исследовании водной фазы, выделенной с помощью хлороформа: для НБ – 66,6 %, ИБК – 47,3 %, ССЯ-76 – 66,6 % от исходного значения, что возможно связано с более сильным разрушающим действием хлороформа.

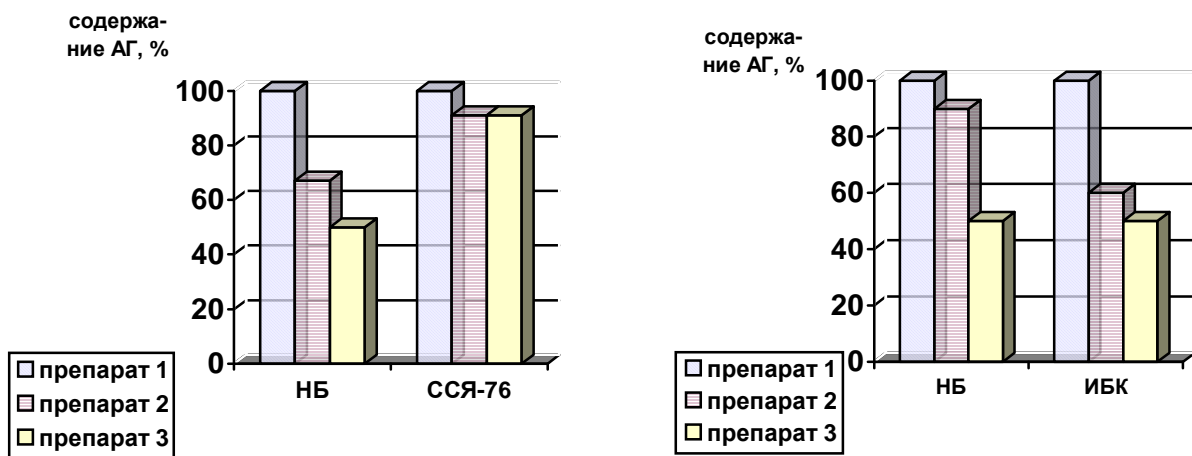
Активность антигена в исходных препаратах и в водной фазе, выделенной из моновалентных вакцин против НБ и ССЯ-76, проверяли в РГА. Результаты, полученные в РГА по обоим образцам моновалентных вакцин, также показали лучшую сохранность антигенов в водной фазе при разделении с использованием изопропилмеристата (табл. 1).

Таблица 1

Содержание антигенов вирусов НБ и ССЯ-76 в РГА (n=3)

№ п/п	Вакцина	Исходная активность антигена (\log_2)	Активность антигена в водной фазе	
			Изопропилмирикат (\log_2)	Хлороформ (\log_2)
1	ССЯ-76	15±0,59	15,0±0,54	14,5±0,67
2	НБ	10±0,63	10,0±0,71	10,0±0,43

Таким образом, результаты оценки содержания антигенов в водной фазе, полученные с использованием реакции геммагглютинации, блокирующего и «сэндвич»- вариантов иммуноферментного анализа были сопоставимы. Однако следует отметить, что РГА не подходит для определения активности антигенов НБ и ССЯ-76 в водной фазе ассоциированных вакцин, так как они оба обладают гемагглютинирующей активностью. Поэтому содержание антигенов в водных фазах двухвалентных вакцин против НБ и ССЯ-76, а также против НБ и ИБК было оценено с применением методов иммуноферментного анализа (рис. 2).



Вакцина против НБ и ССЯ-76

Вакцина против НБ и ИБК

Рис.2. Относительное содержание антигенов вирусов ССЯ-76, НБ и ИБК в водной фазе, выделенной из образцов двухвалентных вакцин с помощью изопропилмеристата (препарат 2) и хлороформа (препарат 3), по сравнению с исходными титрами антигенов (препарат 1).

Концентрация антигенов вирусов НБ и ИБК в водной фазе после разрушения эмульсии была выше при использовании изопропилмеристата, чем хлороформа, а концентрация антигена вируса ССЯ-76 была одинаковой в обоих случаях.

Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее оптимальным из двух предложенных способов выделения водной фазы из эмульгированных инактивированных вакцин является метод, основанный на использовании изопропилмеристата.

Оценка иммуногенности инактивированных вакцин против НБ, ИБК и ССЯ-76. Иммуный ответ у птиц оценивали по уровню накопления специфических антител в крови через 28 суток после введения препаратов эмульсионных инактивированных вакцинах с известной концентрацией антигенов, определенной в ИФА (табл.2, 3).

Таблица 2

Результаты исследования сывороток крови птиц, привитых моновалентными инактивированными вакцинами

№ п/п	Вакцина	Титр АГ	Средний титр антител
1	Серия №8 НБ	1:716±280 (Б-ИФА)	15,2±0,43 log ₂ (РТГА)
2	Серия №30 ИБК	1:154±57 (Б-ИФА)	1:8855±1076 (ИФА)
3	Серия №74 ССЯ-76	1:2560±876 (С-ИФА)	10,8±0,43 log ₂ (РТГА)

Таблица 3

Результаты исследования сывороток крови птиц, привитых ассоциированными инактивированными вакцинами

№ п/п	Вакцина НБ+ ИБК	Титр АГ (Б-ИФА)		Средний титр антител к вирусу НБ (РТГА)	Средний титр антител к вирусу ИБК (ИФА)
		НБ	ИБК		
1	Серия №9	1:614±229	1:77±29	14,8±0,43 log ₂	1:6306±1645
2	Серия №12	1:512±0	1:89±35	14,8±0,43 log ₂	1:6507±1878
3	Серия №14	1:614±229	1:51±14	14,8±0,43 log ₂	1:4538±998
4	Серия №21	1:307±114	1:102±35	12,3±0,67 log ₂	1:6866±2430
5	Серия №27	1:461±114	1:115±29	14,5±0,67 log ₂	1:7660±2609

На основании анализа результатов проведенных исследований было установлено, что все серии моновалентных и ассоциированных вакцин обеспечивали высокий уровень антител против вирусов НБ, ИБК и ССЯ-76.

Результаты оптимизированных нами *in vitro* методов оценки содержания антигенов в инактивированных вакцинах коррелировали с серологическим ответом после вакцинации *in vivo*.

Оценка изменения антигенной активности моновалентных инактивированных вакцин при хранении. С использованием изопропилмеристата были выделены водные фазы из моновалентных вакцин против НБ, ИБК и ССЯ-76, производства ФГУ «ВНИИЗЖ» (по три серии каждой вакцины). Исследования по оценке антигенной активности проводилась в блокирующем и «сэндвич»-вариантах иммуноферментного анализа в трех повторностях. Срок хранения вакцин против ССЯ-76 и ИБК составил 12 месяцев, вакцин против НБ – 14 месяцев. Условия хранения соответствовали требованиям технических условий (ТУ) на эти препараты.

Полученные результаты антигенной активности представлены в таблице 4.

Таблица 4

Антигенная активность моновалентных инактивированных вакцин против НБ, ИБК и ССЯ-76 при разных сроках хранения (n=3)

Моновалентные вакцины	Срок хранения (мес.)	Титр антигена в ИФА	
		В исходном препарате	В водной фазе
Вакцина против НБ	14	1:507±51	1:513±74
Вакцина против ИБК	12	1:170±73	1:154±103
Вакцина против ССЯ-76	12	1:2670±320	1:2560±640

Анализ результатов показал, что хранение моновалентных вакцин против ССЯ-76 и ИБК в течение 12 месяцев не повлияло на специфическую активность препаратов и соответствовало нормам ТУ на данные препараты. Проверка моновалентных вакцин против НБ через 14 месяцев также не выявила значительного снижения активности антигена НБ относительно исходного значения.

Таким образом, анализ результатов проведённых исследований показал, что активность антигенов во всех сериях инактивированных вакцин сохранялась в течение всего срока годности (12 месяцев).

Заключение

Была проведена сравнительная оценка способов выделения водной фазы из инактивированных эмульсионных вакцин для определения относительного содержания антигена в исследуемых образцах. Метод, основанный на использовании изопропилмеристата, обеспечивал большую сохранность антигена при разделении на фракции.

Показана возможность использования данного метода для оценки содержания антигена в вакцинных препаратах при их хранении и для возможного прогнозирования иммуногенной активности инактивированных вакцин.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ №3460.

Список литературы

1. Методические указания по диагностике заболеваний с/х животных и птиц с использованием серологических реакций.- Владимир, 2008 .- Ч.1. –С. 11-19, 111-119, 273-281.
2. Новиков В. В. Иммунология: Учебное пособие /Новиков В. В., Добротина Н. А., Бабаев А. А. - Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2004.- С. 51-56, 129-130
3. Levings R.L. In vitro potency assays for nonreplicating veterinary vaccines: comparison to in vivo assays and considerations in assay development /R. L. Levings, L. M. Henderson, C. A. Metz //Vet Microbiol. -1993. -V. 37. –P. 201-219.
4. Maas R. Development of an in vitro potency test for inactivated Newcastle disease vaccines / R. Maas, M. de Winter, G. Koch [et al.] //Dev in Animal and Veterinary Sciences. - 2000. -V. 31.
5. Singer C. Quantitation of poliovirus antigens in inactivated viral vaccines by enzyme-linked immunosorbent assay using animal sera monoclonal antibodies / C. Singer, F. Knauert, G. Bushar [et al.] //J Biol Stand. -1989. –V. 17. –P. 137-50.
6. Wilbur L. Statistical methods for analysis of in vitro antigen quantification data for veterinary biologic products / L. Wilbur //Vet Microbiol. -1993. –V. 37. –P. 231-240.