

Таблиця – Відхід птиці від ХМ у різних групах птиці

Групи	Бівалентна вакцина при щепленні курчат	Кількість голів у групі	Відхід птиці від ХМ		Імуно-генність, %
			голів	%	
I (курчата одержані від батьків, щеплених в добовому віці бівалентною вакциною SB-1+FC-126)	ІП-24+FC-126 (500+500 ФТО)	21	2	9.5	90.5±6.14
II (курчата одержані від батьків, щеплених в добовому віці бівалентною вакциною ІП-24+FC-126)	ІП-24+FC-126 (500+500 ФТО)	23	7	30.1	69,9±10.03*
контроль (курчата не щеплені, інфіковані контрольним вірулентним штамом)	-	20	20	100	-

Примітка: *) $t_d=1.8$

Таким чином, індекс захисту птиці, яка одержана від батьків, щеплених в попередньому році аналогічною бівалентною вакциною не перевищував 69,9 %, що свідчить про негативний вплив материнських антитіл на ефективність вакцинації. Для остаточного з'ясування впливу материнських антитіл на ефективність вакцинації проти ХМ полівалентними вакцинами необхідні подальші дослідження, оскільки не можна не враховувати актуальність цього питання при щепленні промислових стад курей.

Список літератури

1. Schat, K.A., Calnek, B.W. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl Cancer Inst*, 1978, 60:1075 – 1082.
2. Witter, R.L., Silva, R.F., Lee, L.F. New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected, biological and molecular characteristics. *Avian Dis.* 31:829-840,1987.
3. Witter, R.L. Influence of serotype and virus strain on synergism between Marek's disease vaccine viruses. *Avian Pathol.*, 21:601 – 604, 1992.
4. Кэлнек, Б.У., Виттер, Р.Л. Болезнь Марека. // Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц. – М.: «Аквариум». – 2003 – С. 426-479.
5. Romancswamy, V. et al. *Indian J Avian Sci.* – 1991 – 61: – С. 396.
6. Сюрин, В.Н., Самуйленко, А.Я., Соловьев, Б.В., Фомина, Н.В. Вирусные болезни животных. – М.: ВНИТИБП. – 1998.
7. Білецька, Г.В., Безрукава, І.Ю., Грибова, Н.П., Ракова, Г.А., Бабкін, М.В., Годовський, О.В. Вивчення ефективності вітчизняної бівалентної вакцини проти хвороби Марека в лабораторних та виробничих умовах// *Ветеринарна біотехнологія. Наук.-техн. бюл.* – Ніжин, 2010. – №17.– С. 24-28.

EFFECT OF HOMOLOGICAL MATERNAL IMMUNITY ON THE EFFECTIVENESS OF VACCINATION AGAINST THE MAREK'S DISEASE

Biletska G.V.

Poultry Research Institute of NAAS of Ukraine, Birky, Kharkiv region

Negative effect of homological maternal immunity on the effectiveness of vaccination against the Marek's disease is revealed. In laboratory conditions is has been established that vaccination of parental stocks of hens and their posterity analogical serotypes of the virus, which are in the composition of bivalent vaccine, decreases the immunity production by 20,6 % in comparison with vaccination of posterity by the biopreparation with homological serotypes of the virus.

УДК 619:616.98:578.831:616-078.33

ИЗУЧЕНИЕ АДЪЮВАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ЦЫПЛЯТ ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ

Волкова М.А., Ирза А.В., Фролов С.В., Дрыгин В.В., Капчинский Д. Р.¹

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

¹ARS, США

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) относится к группе цитокинов, является медиатором воспаления и иммунитета. Он продуцируется Т-клетками в ответ на антигенную и митогенную стимуляцию. ИЛ-2 обладает относительно узким спектром мишеней среди иммунокомпетентных клеток. Основные из них – это активированные Т и В-лимфоциты и естественные киллеры (NK-клетки), для которых он является фактором дифференциации и пролиферации. ИЛ-2 воздействует также на моноциты и макрофаги, усиливая их активность. Кроме того, ИЛ-2 стимулирует цитолитическую активность натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов [2, 5]. В ветеринарной практике применяется препарат «Ронколейкин» – рекомбинантный дрожжевой ИЛ-2 человека, являющийся структурным и функциональным аналогом эндогенного ИЛ-2. Он обладает выраженной иммуностимулирующей активностью, направленной на усиление и оптимизацию противобактериального и противовирусного иммунитета.

Целью исследований являлось комплексное изучение иммунного ответа цыплят в ответ на интраназальное введение инактивированных вакцинных препаратов против ньюкаслской болезни (НБ), содержащих в своём составе рекомбинантный ИЛ-2.

Материалы и методы. В качестве специфического антигена использовали инактивированный и концентрированный ультрацентрифугированием вирус НБ штамм «Ла Сота», полученный культивированием в 9-11-суточных эмбрионах СПФ-кур (АГ ВНБ). Активность антигена в реакции гемагглютинации (РГА) составляла не менее 13 log₂. Было изготовлено 4 вакцинных препарата. Приготовление наночастиц фосфата кальция и хитозана для использования в составе вакцин проводили по методикам, описанным Qing He et al. (2002) [3] и A. Vila et al. (2004) с некоторыми модификациями [4]. Два препарата имели композиционный состав, включающий антиген вируса НБ и иммуностимулирующие вещества: частицы фосфата кальция и целлюлозы (препарат №1) и хитозана (препарат №2). Два других вакцинных препарата готовили простым смешиванием равных объёмов антигена вируса НБ и фосфатно-буферного раствора (ФБР). Непосредственно перед применением в состав образцов вакцин № 1-3 вводили препарат «Ронколейкин» (ООО Биотех, Санкт-Петербург, Россия) в расчёте 400 МЕ/голову. Последний препарат (№4) играл роль положительного контроля, относительно которого оценивали адъювантное действие имму-

ностимулирующих веществ. Компоновку вакцинных препаратов осуществляли с таким расчетом, чтобы количество АГ ВНБ в прививном объеме было одинаковым для всех конструкций препаратов.

Были сформированы 5 опытных групп 23-суточных коммерческих цыплят по 6 голов в каждой. Цыплят первых четырех опытных групп вакцинировали интраназально трёхкратно с интервалом в 6 суток образцами вакцин в объёме 0,2 см³. Цыплята 5 группы оставались интактными и служили в качестве отрицательного контроля. Отбор проб крови и трахеальных смывов от цыплят проводили до иммунизации и с недельным интервалом после третьей иммунизации.

ИФА для определения титра иммуноглобулинов класса G в сыворотках крови и трахеальных смывах цыплят проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями [1]. Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

РТГА проводили с использованием коммерческого набора для выявления антител к вирусу НБ в РТГА (ФГУ «ВНИИЗЖ») согласно инструкции по применению. За положительный уровень антител к вирусу НБ принимали разведение сыворотки, равное 4 log₂ и выше.

Выделение лимфоцитов из периферической крови кур проводили по стандартной методике с использованием Ficoll-Paquetm PLUS (Amersham Biosciences, Швеция). Подготовку проб для выявления поверхностных маркеров лимфоцитов осуществляли с использованием меченных моноклональных антител фирмы Southern Biotech, США: CD4-PE и CD8α-FITC. 50 мкл суспензии лимфоцитов инкубировали с 2 мкл меченных антител в течение 30 мин. при температуре +4 °С. Фракцию лимфоцитов отмывали однократно ФБР центрифугированием в течение 10 мин. при 300 g. Осадок ресуспендировали в 1 мл BD FACS Flow буфера (BD Biosciences). Количественный анализ клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur (Becton, Dickinson, США). Измерение и обработку полученных результатов осуществляли с использованием программного обеспечения Cell Quest Pro 1.0.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований изучали иммуногенную активность вакцин против ньюкаслской болезни, содержащих рекомбинантный интерлейкин-2, при применении на слизистые оболочки. При этом проводили комплексные исследования, направленные на изучение гуморального, секреторного и клеточного иммунного ответа цыплят. В табл. 1 представлены результаты исследования сывороток крови в РТГА, из которых следует, что рекомбинантный ИЛ-2 существенно повышал уровень гемагглютинирующих антител к антигену ВНБ при их совместном введении цыплятам, по сравнению с отдельным применением вирусного антигена, на протяжении всего срока наблюдения.

Таблица 1 – Титры антител к вирусу ньюкаслской болезни в сыворотках крови цыплят в РТГА после вакцинации мукозальными препаратами

Вакцина	Средний титр антител к вирусу НБ в РТГА, log ₂					
	До вакцинации	Срок после последней вакцинации, нед.				
		1	2	3	4	5
АГ ВНБ+САР+ИЛ-2	1,6 (0,8) 0/5*	6,7 (1,0) 6/6	5,6 (1) 6/6	4,7 (0,8) 6/6	6,0 (1,4) 5/5	4,6 (1,1) 4/5
АГ ВНБ+хитозан +ИЛ-2		6,2 (2,8) 6/6	5,6 (1,9) 5/6	4,0 (1,0) 5/6	5,2 (0,4) 5/5	2,8 (1,6) 2/5
АГ ВНБ+ИЛ-2		9,3 (1,2) 6/6	6,7 (2,1) 6/6	5,0 (1,3) 6/6	6,4 (1,1) 5/5	5,0 (1,2) 5/5
АГ ВНБ+ФБР		5,5 (2,9) 5/6	5,8 (1,1) 6/6	3,3 (1,5) 4/6	5,6 (0,9) 5/5	4,4 (0,9) 4/5
Контроль		0 0/6	0 0/6	0 0/6	0 0/6	1,2 (1,6) 0/6

Примечание: * - положительные пробы/общее количество проб; - в круглых скобках указана стандартная ошибка среднего

Пик выработки специфических антител (при исследовании в РТГА) был отмечен через 1 неделю после третьей вакцинации, при этом средний титр антител в группе цыплят, иммунизированных препаратом с ИЛ-2, был почти на 4 log₂ выше, чем у цыплят, привитых одним антигеном.

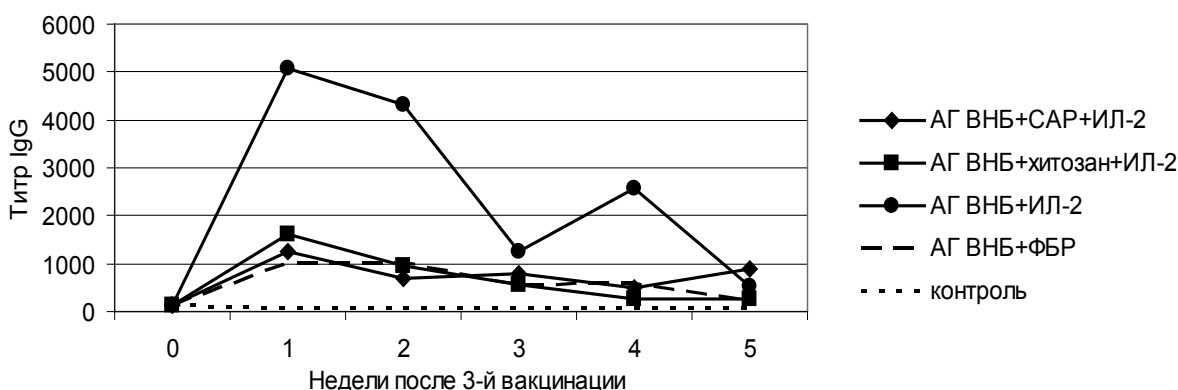


Рис. 1 Иммуногенная активность мукозальных препаратов при исследовании сывороток крови методом ИФА

Примечание: титр иммуноглобулинов выражен величиной, обратной разведению сыворотки

При исследовании сывороток крови цыплят этой группы (№ 3) в ИФА был отмечен высокий уровень IgG в течение 4 недель после последней вакцинации. Вакцина с САР-частицами при совместном введении с ИЛ-2 также показала более высокую иммуногенность по сравнению с контрольным препаратом антигена. Гуморальный иммунный ответ на совместное введение вакцинного препарата с хитозаном и ИЛ-2 был более слабым, чем на другие мукозальные препараты.

Включение в состав вакцинных препаратов ИЛ-2 оказывало также влияние на мукозальный иммунный ответ цыплят. В течение времени наблюдения более сильный мукозальный иммунный ответ наблюдали у цыплят после иммунизации препаратами №1-3, по сравнению с препаратом №4 (АГ ВНБ+ФБР). При этом у цыплят, иммунизированных вакциной с САР-частицами и ИЛ-2, и препаратом антигена вируса НБ с ИЛ-2 наблюдали более высокие титры IgG в трахеальных смывах через 1 и 4 недели после последней вакцинации (рис. 2).

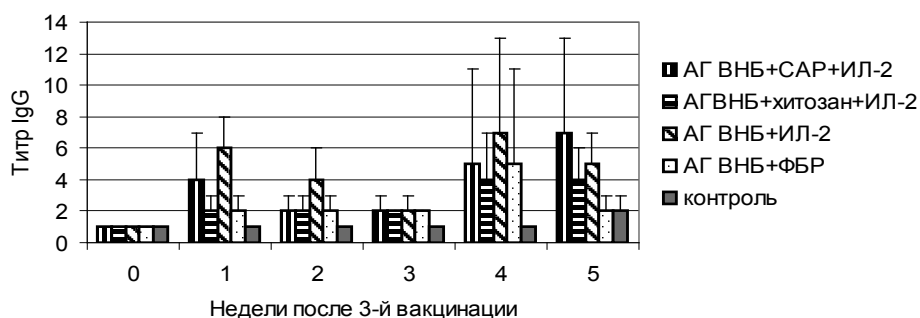


Рис. 2 Иммуногенная активность мукозальных препаратов при исследовании трахеальных смывов методом ИФА

Примечание: титр иммуноглобулинов выражен величиной, обратной разведению пробы.

При изучении клеточного иммунитета проводили сравнительную оценку фенотипических изменений в иммунограмме птиц после 3-х кратного введения экспериментальных вакцин. Результаты количественного определения субпопуляций Т-лимфоцитов представлены на рис. 3 и 4.

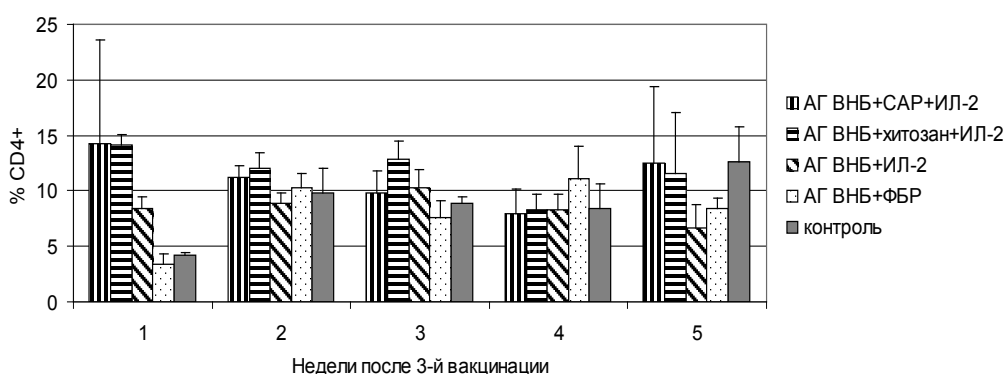


Рис. 3 Динамика уровня субпопуляции CD4⁺ клеток в лимфоцитах периферической крови цыплят экспериментальных групп в разные сроки после третьей вакцинации.

Примечание: Результаты представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение (n=3).

Вакцинация цыплят мукозальными препаратами индуцировала увеличение продукции иммунокомпетентных клеток. Через 1 неделю после 3-й вакцинации количество CD4⁺ клеток в периферической крови цыплят, иммунизированных препаратами с иммуностимулирующими веществами, было выше, чем у контрольных цыплят и птицы, вакцинированной одним антигеном без адъюванта (рис. 3). При этом превышение объёма CD4⁺ клеток у опытных цыплят, по сравнению с контрольными было 2-кратным при вакцинации препаратом с одним ИЛ-2, и 3-кратным при иммунизации препаратами с комбинированными адъювантами. Увеличение объёма CD8⁺ клеток, по сравнению с контрольной группой отмечали в крови цыплят, вакцинированных препаратом №1 через одну, а №2 и №3 через две недели после вакцинации (данные не показаны). Анализируя значение отношения CD4⁺/CD8⁺ в течение 1-4 недель после третьей вакцинации можно отметить общую тенденцию к его снижению у всех групп. Наибольшее значение CD4⁺/CD8⁺ было отмечено через 1 неделю после вакцинации у цыплят, иммунизированных антигеном с ИЛ-2 (8,45), что в 2 раза больше, чем в контрольной группе. У цыплят, иммунизированных вакциной с хитозаном и ИЛ-2, этот показатель был примерно на уровне контрольной группы в течение всего времени наблюдения. При иммунизации вакциной с САР-частицами и ИЛ-2 увеличение отношения CD4⁺/CD8⁺ по сравнению с контрольной группой было отмечено через 2 недели после 3-й вакцинации (в 1,4 раза).

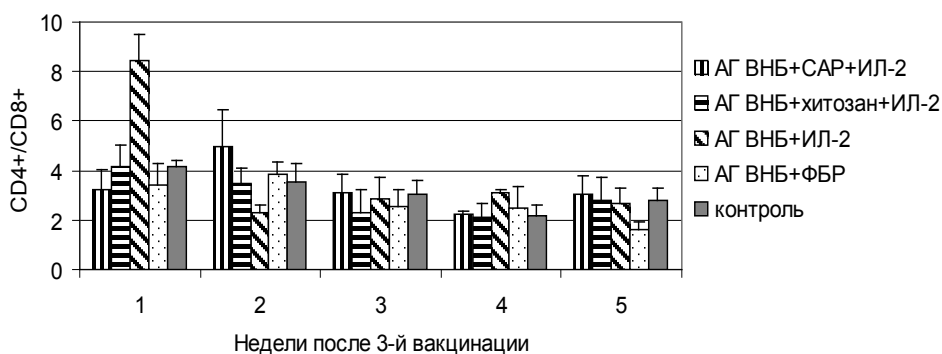


Рис. 4 Динамика отношения CD4⁺/CD8⁺ в лимфоцитах периферической крови цыплят экспериментальных групп в разные сроки после третьей вакцинации.

Примечание: Результаты представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение (n=3).

Таким образом, анализируя полученные данные иммунофенотипирования лимфоцитов можно сделать вывод, что введение в состав вакцинных препаратов рекомбинантного интерлейкина-2 и комбинированных адъювантов вызывало существенное изменение фенотипа Т-клеток, особенно через одну неделю после третьей вакцинации.

Выводы. Проведенные комплексные исследования иммунного ответа цыплят на интраназальное введение экспериментальных мукозальных вакцин против НБ показали, что интерлейкин-2 при отдельном введении и в комбинации с САР-частицами усиливал мукозальный и гуморальный иммунный ответ. На основании изучения фенотипа Т-лимфоцитов периферической крови цыплят после вакцинации было установлено, что интерлейкин-2 обладал адъювантной активностью и усиливал клеточный иммунный ответ на антиген вируса НБ при интраназальном введении.

Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ 3460р.

Список литературы

1. Применение иммуноферментной тест-системы для выявления специфических IgA, IgM и IgG к вирусу ньюкаслской болезни птиц в секреторных жидкостях и сыворотках крови кур / М.А. Волкова, А.В. Ирза, М.Е. Качалова, Н.С. Мудрак, В.В. Дрыгин, В.В. Борисов, С.К. Старов // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2007. – Т. 6. – С. 176-185. 2. AL-Garib, S.O. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination / S. O. Al Garib, A.L. Gielkens, E. Druys, G. Koch // World's Poultry Science Journal. – 2003. – V. 59. – P. 185-200. 3. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against Herpes Simplex virus type 2 / Qing He, A. Mitchell, T. Morcol and S.J.D. Bell // Clinical and diagnostic laboratory immunology. – 2002. – V. 9. – P. 1021-1024. 4. Illum, L. Chitosan as a novel delivery system for vaccines / L. Illum, Jabbal-Gill, M. Hinchcliffe et al. // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2001. – V. 51(3). – P. 81-96. 5. Wigley, P. Avian cytokines in health and disease / P. Wigley, P. Kaiser // Brazilian Journal of Poultry Science. – 2003. – V.3. – P. 1-8.

STUDY OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 AS ADJUVANT UPON INTRANASAL VACCINATION OF CHICKEN AGAINST NEWCASTLE DISEASE

Volkova M.A., Irza A.V., Frolov S.F., Drygin V.V., Kapchinsky D.R.¹

FGI "Federal Centre for Animal Health" (FGI "ARRIAH"), Vladimir,

¹ARS, USA

The immunomodulating activity of recombinant human IL-2 expressed in yeast was studied following intranasal coadministration of chickens with inactivated Newcastle disease virus (NDV) vaccine. After three vaccinations with inactivated NDV containing recombinant IL-2, or in combination with calcium phosphate-particles and chitosan, a significant increase in antibody titers in blood and tracheal washings was observed when compared with the administration of only antigen. The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in peripheral blood of chicks immunized by preparations with immunopotentiators was higher 1-2 weeks following the 3rd vaccination as compared to control birds and birds vaccinated by antigen alone. Thus, human interleukin-2 efficiently changed cellular, mucosal and humoral immunity and it makes it possible to use it in the future as a potential adjuvant for production of vaccines for poultry.

УДК 578.831:615.371

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ІМУНОГЕННОСТІ ПРОТИПАНДЕМІЧНИХ ГРИПОЗНИХ ВАКЦИН 3 ОСОБЛИВОСТЯМИ ЇХ ПРОТЕЇДНОГО СКЛАДУ

Волянський А.Ю.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України», м. Харків

Грип – одне з поширеніших захворювань вірусної етіології, летальність від наслідків якого є найбільшою серед усіх інфекційних хвороб. У ХХ сторіччі було зареєстровано чотири пандемії (1918, 1957, 1968, 1977 рр.). Тільки одна з них, 1918-1919 рр., забрала життя більше ніж 20 мільйонів людей[1]. Навесні 2009 р. розпочалася остання пандемія, що була спричинена новим штамом А/Н1N1/Каліфорнія. Перша хвиля не зачепила Україну, але під час другої, з жовтня 2009 по січень 2010 перехворіло біля 5 мільйонів та померло більш, ніж 1000 українців. Це значно менш, ніж померло протягом минулого року від СНІДу та туберкульозу, але потрібно враховувати те, що максимальна захворюваність спостерігалась у осіб молодого віку, соціально адаптованих, але маючих в більшості випадків фонову хронічну патологію. Третя хвиля в сезоні 2010-2011рр. характеризувалася значно меншою інтенсивністю епідемічного процесу та сумісною циркуляцією декількох штамів грипу. Тем не менш, в лютому 2011 року пандемічний штам був знову включений ВОЗ до складу актуальних вакцин на сезон 2011-2012рр. для Північної півкулі.

Дуже велика захворюваність жителів України в порівнянні з сусідніми країнами під час цієї пандемії зумовлена кількома факторами, але головніший, на нашу думку – відмова від щеплення населення. Жодна з протипандемічних вакцин не була зареєстрована в Україні. У Світі було вакциновано біля мільярду осіб, у Західній Європі – більш ніж 100 мільйонів людей. У сусідніх Росії та Білорусі було щеплено за державні кошти протипандемічними вакцинами більш ніж 15 мільйонів та 500 000 представників груп ризику відповідно.

Враховуючи те, що протягом дуже короткого часу було розроблено та випробувано декілька нових препаратів, ми спробували проаналізувати на імуногенність та особливості нуклеопротеїдного складу різних протипандемічних вакцин та надати рекомендації для подальшої оптимізації їх розробки та виробництва, підвищення їх ефективності.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом дослідження було обрано моновалентні протипандемічні вакцини розробки та випуску 2009 р.: «Паненза» (Санофі Пастер, Франція), «МоноГриппол» (ООО «Петровакс»), «МоноГриппол Нео Плюс» (ООО «Петровакс»), субодиночний субстрат вакцини «МоноГриппол» (НДІ вакцин та сироваток, Санкт-Петербург, Росія).

Препарат «Паненза» являє собою інактивовану моновалентну розщеплену безад'ювантну вакцину проти вірусу грипу А(Н1N1), що містить 15 мкг гемаглютиніну ізольованого штаму вірусу А/California/07/2009 (Н1N1) на дозу. В індивідуальних формах випуску не містить консерванту, протипоказана особам з підтвердженою тяжкою гіперчутливістю до яєчного білку, який входить до складу вакцини.

«МоноГриппол» є інактивованою моновалентною субодиночною ад'ювантною вакциною проти А(Н1N1). Антигени отримані з очищеного вірусу А(Н1N1), вирощеного на курячих ембріонах. В склад вакцини входить гемаглютинін та нейрамінідаза в кількості 5 мкг (в перерахунку на гемаглютинін) та імуномодулятор «Поліоксідоній».

«МоноГриппол Нео» є інактивованою моновалентною субодиночною ад'ювантною вакциною проти А(Н1N1). Її склад є аналогічним складу вакцини «МоноГриппол», але антигени отримані з очищеного вірусу А(Н1N1), вирощеного на перещеплюваній клітинній лінії нирки свавця (Madin-Darby canine kidney (MDSK)).