

ПОДБОР АДЬЮВАНТОВ ДЛЯ ВАКЦИНЫ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ Sars-Cov-2, И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА НОРОК

Д. С. БОРИСОВЕЦ (ORCID ID 0000-0003-4087-9833),
Ю. А. КАЯК (ORCID ID 0009-0007-3622-0880), Г. Е. ТОЛЯРОНОК

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселеского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063

(Поступила в редакцию 15.01.2025)

В статье приведены результаты исследования по подбору оптимальных адьювантов при конструировании вакцины инактивированной для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2 и пастереллеза норок на лабораторных животных. Установлено, что при разработке вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2 и пастереллеза норок, более высокие показатели иммуногенности, отражающие стимулирование гуморального иммунного ответа, были получены при применении в 15%-ной концентрации. Анализ заболеваемости пушных зверей в последние годы выявил, что наибольший урон отрасли наносят так называемые факторные инфекции, преимущественно поражающие молодых особей и проявляющиеся диареей и респираторными симптомами. Создание устойчивого и долговременного иммунитета у хищных животных, включая норок, во время прививок против вирусов, определяется несколькими параметрами: состоянием здоровья животного, количеством и качеством антигенов в вакцине, способом прививания (дозировкой, местом инъекции и так далее), а также правильным выбором и применением неспецифических стимуляторов иммунной системы – адьювантов. Результативность добавочных компонентов зависит от первоначального состояния иммунной системы тела перед прививкой. Адьюванты изменяют скорость формирования иммунной реакции, стимулируя её раннее проявление, увеличивая силу и удлиняя время действия. Выбор адьюванта для определенной вакцины должен базироваться на детальном исследовании пропорции возможной выгоды от повышения иммуностимулирующего действия вакцины по сравнению с вероятностью появления локальных и системных побочных эффектов. Важно помнить, что использование высоких доз адьювантов может вызвать иммуносупрессию. В случае применения низких доз наблюдается кратковременный рост уровня иммуноглобулинов, который не превышает 2–3 месяцев.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, Sars-Cov-2, пастерелла, адьюванты, образцы вакцин, кролики, иммуногенная активность.

The article presents the results of a study on the selection of optimal adjuvants in the design of an inactivated vaccine for the prevention of coronavirus infection caused by the SARS-Cov-2 virus and mink pasteurellosis in laboratory animals. It was found that when developing a vaccine for the prevention of coronavirus infection caused by the SARS-Cov-2 virus and mink pasteurellosis, higher immunogenicity rates, reflecting the stimulation of the humoral immune response, were obtained when used in a 15% concentration. Analysis of the incidence of fur animals in recent years has revealed that the greatest damage to the industry is caused by so-called factor infections, mainly affecting young individuals and manifested by diarrhea and respiratory symptoms. The creation of stable and long-term immunity in predatory animals, including minks, during vaccination against viruses is determined by several parameters: the health of the animal, the quantity and quality of antigens in the vaccine, the method of vaccination (dosage, injection site, etc.), as well as the correct choice and use of non-specific stimulants of the immune system – adjuvants. The effectiveness of additional components depends on the initial state of the body's immune system before vaccination. Adjuvants change the rate of formation of the immune response, stimulating its early manifestation, increasing the strength and prolonging the duration of action. The choice of an adjuvant for a particular vaccine should be based on a detailed study of the proportion of the possible benefit from increasing the immunostimulating effect of the vaccine compared to the likelihood of local and systemic side effects. It is important to remember that the use of high doses of adjuvants can cause immunosuppression. In the case of using low doses, a short-term increase in the level of immunoglobulins is observed, which does not exceed 2-3 months.

Key words: coronavirus infection, SARS-Cov-2, pasteurella, adjuvants, vaccine samples, rabbits, immunogenic activity.

Введение

Анализ заболеваемости пушных зверей в последние годы выявил, что наибольший урон отрасли наносят так называемые факторные инфекции, преимущественно поражающие молодых особей и проявляющиеся диареей и респираторными симптомами.

Большинство специалистов сходятся во мнении, что ключевым элементом борьбы с этой группой заболеваний является специфическая профилактика. Вакцинация позволяет достичь определенного уровня стадного иммунитета, что снижает циркуляцию возбудителя и защищает отдельных животных [1].

Стандартная технология производства противовирусных вакцин предусматривает использование вирусов, культивированных на клеточной культуре, с последующей инактивацией. Некоторые вирусы обладают низкой активностью и накапливаются в культуре клеток в небольших количествах. В этом случае для очистки от примесей и концентрации применяют центрифугирование.

Для повышения эффективности вакцины в инактивированную вирусную суспензию добавляют адьюванты, что позволяет получить высокоактивный препарат.

В зависимости от вида животных, их возраста, пола и технологии содержания, как правило, требуется иммунитет сроком 6–12 месяцев и более [1].

Для усиления антигенной активности биопрепаратов также используются рекомбинантные антигены. При одновременном введении антигена с адъювантами наблюдается существенное увеличение иммунного ответа как по количеству антителообразующих клеток, так и по титру антител. Однако такая вакцинация не гарантирует продолжительной иммунной защиты [2].

В медицинской и ветеринарной практике широкое распространение получили соли алюминия (гидроокись алюминия, фосфат алюминия, алюмокалиевые квасцы) в качестве адъювантов. Наиболее часто антиген смешивают с заранее сформированными гелями $Al(OH)_3$ или $AlPO_4$. Вакцины, приготовленные с использованием таких адъювантов, именуются сорбированными или адсорбированными. Многие адсорбированные вакцины демонстрируют достаточную антигенность у людей при первичной иммунизации.

Ввиду их умеренной эффективности и безопасности, данные вакцины пользуются предпочтением в медицинской практике.

В последнее время в практику внедрен новый тип адъюванта на основе минеральных и неминеральных масел и их смесей. При его использовании предварительно растворенный или суспендированный в воде антиген тонко диспергируют в масле, образуя эмульсию типа «вода в масле», где капельки воды с антигеном находятся в масляной фазе.

Несмотря на свою эффективность, вакцины на основе масляных адъювантов обладают рядом недостатков, таких как токсичность, высокая вязкость и недостаточная стабильность. Для преодоления этих проблем в состав вакцин был включен гидрофильный эмульгатор – твин-80, используемый в концентрации 1–5 % (об/об).

Введение животным эмульсии «антиген-адъювант» приводит к образованию гранулемы в месте инъекции. Гранулема стимулирует активность макрофагов и лимфоцитов, что усиливает иммунный ответ. Однако, в связи с длительным сохранением гранул, подобные адъюванты противопоказаны для применения у человека.

Использование некоторых масляных адъювантов, содержащих Арласел А, было прекращено из-за выявления канцерогенных свойств адъюванта. Вакцины на основе водно-масляной эмульсии обычно вводят животным внутримышечно.

Метаболические особенности минерального масла обуславливают длительное удержание капель эмульсии с антигеном в месте инъекции [2].

В целях компенсации ограничений минеральных адъювантов были исследованы растительные масла в качестве альтернативы. Адъювант на основе высокоочищенного арахисового масла с добавлением глицерина и лецитина в качестве эмульгатора продемонстрировал низкую реактогенность и достаточную эффективность в вакцинах для животных. Существуют данные о потенциальной эффективности двойных эмульсий (вода-масло-вода), полученных путем повторного эмульгирования простых эмульсий (вода в масле) в растворах детергента твин-80. Установлено, что по своим адъювантным свойствам они превосходят традиционные гидроокиси алюминия (ГОА). Это было подтверждено при оценке иммуногенных свойств инаktivированных эмульгированных вакцин против ящура, везикулярной болезни, болезни Тешена и Ауески в сравнении с вакцинами, содержащими ГОА. Однако основной недостаток водно-масляных эмульсий – их нестабильность, высокая реактогенность и склонность к образованию абсцессов в месте инъекции – значительно ограничивают их практическое применение [2].

В особенности это относится к высокореактогенному препарату Маркол. Аналогичная ситуация наблюдается с Монтанидами (например, ISA 70 и другие), созданными на основе минеральных масел. К сожалению, в Республике Беларусь пока отсутствуют Монтаниды на основе синтетических масел, несмотря на многочисленные запросы на их поставку со стороны компании «Seppic» и ее российских представителей.

В звероводстве масляные вакцины не получили широкого распространения.

Формирование стойкого и длительного иммунитета у плотоядных животных, в том числе норок, при вакцинации против вирусных заболеваний, зависит от множества факторов: состояния здоровья животного, количества и качества антигена в препарате, метода вакцинации (дозировки, места введения и др.), а также от правильного выбора и использования неспецифических стимуляторов иммунитета – адъювантов [2].

Эффективность адъювантов определяется исходным иммунным статусом организма до вакцинации. Адъюванты модифицируют кинетику развития иммунного ответа, ускоряя его наступление, повышая интенсивность и продлевая продолжительность [4, 5].

Подбор адьюванта для конкретной вакцины должен основываться на тщательном анализе соотношения потенциальной пользы от усиления иммуногенности вакцины с риском возникновения местных и системных реакций [6].

Необходимо учитывать, что применение повышенных доз адьювантов может привести к иммуносупрессии. При использовании низких доз наблюдается кратковременный пик концентрации иммуноглобулинов, не превышающий 2–3 месяцев [7].

Отметим, что в ветеринарной и медицинской практике дозировки гидрата окиси алюминия в анти COVID-19 вакцинах существенно различаются (от 0,5 % до 1,5 % по массе).

Цель исследования – подбор оптимальных адьювантов при конструировании инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2 и пастереллеза норок.

Основная часть

Исследования по подбору оптимального адьюванта для вакцины «Ковпаст», предназначенной для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом Sars-Cov-2, и пастереллеза норок, проводились в отделе вирусных инфекций вивария Республиканского унитарного предприятия «Институт экспериментальной ветеринарии имени С. Н. Вышелесского».

Культивирование коронавируса (изолята SARS-CoV-2 №1/3947) осуществлялось на культуре клеток Vero E6 в питательной среде ДМЕМ с добавлением антибиотика гентамицина в концентрации 50 мкг/мл. Удаление клеточного детрита производилось посредством капсульного мембранного фильтра из полиэфирсульфона с размером пор 0,65 мкм. Инактивация вируса осуществлялась химическим методом с использованием β -Propiolactone в конечной концентрации 0,05 %.

Процедуры концентрирования и очистки проводились с применением системы тангенциальной фильтрации Sartoflow Smart Cross Flow System (Sartorius, Германия) с использованием фильтрующей кассеты Sartocon Slice 200 ECO с размером 300 кДа.

Получение биомассы *P. multocida* (сероваров А и В) осуществлялось путем культивирования в жидкой питательной среде Хаймеда с добавлением 5 % стерильной сыворотки в реакторе.

Полученные 10-часовые культуры пастерелл были очищены методом центрифугирования с использованием высокоскоростной проточной центрифуги. После инактивации штаммов *P. multocida* (сероваров А и В) формалином в концентрации 0,5 %, была определена концентрация взвесей, которая Subsequently была доведена до необходимых 6,0 ед с помощью денситометра по Мак-фарленду.

Культуры *P. multocida* обоих сероваров были смешаны в стерильном флаконе в соотношении 1:1.

Лабораторные образцы вакцины были получены путем концентрирования и очистки, включающей смешивание инактивированных штаммов вируса Sars-Cov-2 и реакторных бульонных культур *Pasteurella multocida* (сероваров А и В) в соотношении 2:1 (вирус: смесь бактерий).

В первом образце в качестве адьюванта использовался «Montanide ISA 15A VG» в соотношении 15 % к 85 % антигенной части. Соединение компонентов проводилось при комнатной температуре (+18 °С – +24 °С), при этом адьювант добавлялся в антигенную часть постепенно, с перемешиванием со скоростью 100 об/мин. в течение 5–7 минут. Все манипуляции проводились в стерильном боксе с использованием стерильной посуды. В результате была получена эмульсия антигена типа «масло в воде», предназначенная для формирования у пушных животных иммунитета, средней продолжительности.

Во втором образце биологического препарата в качестве адьюванта был использован гидрат окиси алюминия. В антигенную составляющую препарата был добавлен стерильный раствор гидроксала шестой концентрации в объеме 15 %.

В третьем образце вакцины использовался 10%-й стерильный раствор алюмокалиевых квасцов в качестве адьюванта, который добавляли в количестве 5 % от общего объема препарата.

После приготовления все образцы вакцины были разлиты по трем стерильным флаконам номинальным объемом 100,0 см³. Флаконы герметично закрывали резиновыми пробками и обжимали алюминиевыми колпачками. На флаконы наклеивались этикетки, после чего образцы хранились при температуре от +2 до +8 °С.

В результате было получено 120 мл (доз) лабораторного образца вакцины в трех вариантах исполнения (по 3 флакона с 40 см³ препарата в каждом).

Оценка безопасности изготовленных лабораторных образцов вакцины проводилась путем однократного подкожного введения дозы 0,5 см³ белым мышам массой 18–20 г. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 10 дней. Для каждого образца использовали по 10 белых мышей.

Определение реактогенности и стерильности вакцины проводилось в соответствии с установленными стандартами.

Реактогенность вакцины оценивалась на кроликах при однократном внутримышечном введении в дозе 1,0 см³. Животные находились под наблюдением в течение 10 дней, включая ежедневный клинический осмотр с измерением температуры тела. По истечении 10 дней после инъекции проводился вскрытие животных с целью оценки состояния места введения вакцины. Для каждого образца вакцины использовалось по 2 кролика.

В случае отсутствия каких-либо клинических признаков заболевания и местных реакций на введение препарата по истечении срока наблюдения, образец считался не реактогенным.

Стерильность вакцины проверялась методом прямой посева на питательную среду в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Беларусь II издания, том 1, статья 2.6.1. Отсутствие роста микрофлоры в пробирках с посевами вакцины подтверждало ее стерильность.

Для исключения ложноположительного результата из-за возможного помутнения среды эмульсий, дополнительно проводилась посев 0,1 см³ бульона первого эмульгированного образца на аналогичную стерильную питательную среду на 3 день культивирования.

Культивирование посевов проводилось в течение 10 суток, дополнительный отсев – в течение 7 суток. В этот период осуществлялся мониторинг роста (или его отсутствия) на протяжении 10 дней. Отсутствие роста свидетельствовало о стерильности образцов.

Лишь после подтверждения стерильности, безопасности и ареактогенности трех лабораторных образцов вакцины с различными адьювантами, были проведены дальнейшие исследования.

Для оценки антигенной активности лабораторного образца вакцины было сформировано 4 группы кроликов по 3 особи в каждой. В течение 21 дня после однократного внутримышечного введения в область задней части бедра 1,0 см³ соответствующего образца препарата (первый, второй или третий) в трех опытных группах, у контрольной группы кроликам вводился стерильный изотонический раствор натрия хлорида с гидроксидом в той же дозе.

До начала иммунизации и на 21-е сутки после нее у всех подопытных кроликов отбирались пробы крови для получения сыворотки и последующего определения титра антител.

В рамках экспериментальной процедуры, помимо стандартного срока забора крови, у второй группы кроликов дополнительно осуществлялся забор биоматериала на 58-й день исследования.

Табл. 1 демонстрирует схему введения трех образцов лабораторной вакцины с использованием различных адьювантов и временных интервалов.

Таблица 1. Схема введения 3 вариантов лабораторного образца вакцины подопытным кроликам

	Наименование групп			
	1 опытная группа	2 опытная группа	3 опытная группа	Контроль группа
Используемые адьюванты	Алюмокальциевые квасцы	Гидроксид	Масляный, ISA 15	Физ-раствор с ГОА
Количество голов	3	3	3	3
Дата вакцинации в/м (6.03.23г.)	по 1,0 см ³	по 1,0 см ³	по 1,0 см ³	по 1,0 см ³
Дата 1-го взятия крови (3.03.23г.)	3	3	3	3
Дата 2-го взятия крови (27.03.23г.)	3	3	3	3
	21 день			
Дополнительно взято (3.05.2023г.)	58 дней	3	Не отбиралась	Не отбиралась

Для проведения реакции микроагглютинации (РМА) антигены были получены из гомологичных культур. Титры антител к возбудителю пастереллеза определялись в объеме 0,05+0,05 мл с применением метода РМА.

Изучение титров антител к коронавирусу проводилось методом ИФА.

В соответствии с установленным критерием, уровень специфических антител к *P. multocida* серовара А в реакции агглютинации 1:16 и выше считался защитным по отношению к возбудителю пастереллеза.

Аналогично, у иммунизированных животных титры антител 3 log₂ и более рассматривались как минимально достаточный уровень для обеспечения защиты от коронавирусной инфекции у норок (определяемый по коэффициенту позитивности).

При исследовании эффективности вакцины «Ковпаст» с различными адьювантами у кроликов было отмечено повышение титр специфических антител к антигенам, содержащимся в вакцине. Наблюдение за клиническим состоянием животных показало отсутствие каких-либо признаков заболевания в течение всего эксперимента.

Данные по уровню поствакцинальных антибактериальных антител, полученные методом реакции агглютинации (РА), при оптимизации состава адьюванта для инактивированной вакцины «Ковпаст», предназначенной для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом Sars-Cov-2, и пастереллеза норок, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты реакции агглютинации с антигеном *Pasteurella multocida* лабораторного образца вакцины у кроликов

Группы	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контрольная
Используемые адъюванты	Алюмокалиевые квасцы	Гидрат окиси алюминия	Масляный, ISA 15	Физраствор с ГОА
Начало опыта, до введения препарата	3,0	2,7	3,0	2,3
На 21 день после введения препарата	5,3	6,0	6,0	2,7

Результаты поствакцинальных противовирусных антител в ИФА при подборе оптимального адъюванта при конструировании инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2 и пастереллеза норки приведены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты поствакцинальных противовирусных антител при подборе оптимального адъюванта у кроликов

Группы	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контрольная
Используемые адъюванты	Алюмокалиевые квасцы	Гидрат окиси алюминия	Масляный, ISA 15	Физ. раствор с ГОА
Начало опыта, до введения препарата	0,27	0,2	0,23	0,3
На 21 день после введения препарата	4,0	6,5	6,0	0,3

Все три варианта исследуемой вакцины с различными адъювантами соответствуют требованиям стерильности, безвредности и ареактогенности.

Анализ уровня специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови привитых животных указывает на выраженную динамику образования антител к обоим компонентам вакцины. Наиболее высокая степень иммунного ответа наблюдалась при использовании гидрата окиси алюминия в качестве адъюванта.

При использовании масляного адъюванта ISA-15 получено повышение уровня титра антибактериальных антител в сыворотках крови кроликов до значений $4,5 \pm 0,00 \log_2$, с использованием алюмокалиевых квасцов, $4,0 \pm 0,00 \log_2$, гидроксала $4,9 \pm 0,00 \log_2$ к *Pasteurella multocida* А и В.

При использовании масляного адъюванта ISA-15 получено повышение уровня титра антибактериальных антител в сыворотках крови кроликов до значений $4,5 \pm 0,00 \log_2$, с использованием алюмокалиевых квасцов, $4,0 \pm 0,00 \log_2$, гидроксала $4,9 \pm 0,00 \log_2$ к вирусному антигену Sars-CoV-2.

При определении ректогенности и безвредности по истечении срока наблюдения животные оставались живыми и клинически здоровыми и общей реакции организма на введение препарата не отмечалось. Местная реакция на введение препарата отсутствовала.

Заключение

1. Анализируя полученные данные при проведении серологических исследований сывороток крови кроликов, иммунизированных вакциной «Ковпаст» для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом Sars-Cov-2 и пастереллеза норки, установлено, что все исследуемые адъюванты оказывают положительное влияние на синтез специфических антител.

2. При подборе оптимального адъюванта при изготовлении вакцины «Ковпаст», более высокие показатели иммуногенности были получены при применении адъюванта гидроксала.

3. Общих и местных изменений в клиническом состоянии, аллергических реакций не выявлено после введения биопрепаратов (трех вариантов). На протяжении всего опыта животные сохраняли активность и аппетит, болезненность и воспалительных реакций на месте введения образцов вакцины не наблюдалось.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красочко, П. А. Современные подходы к классификации иммуномодуляторов / П. А. Красочко // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2006. – № 2. – С. 35–40. 2. <https://meduniver.com/Medical/Microbiology/957.html>.
2. Медуницын, Н. В. Вакцинология. Изд. 2-е, перераб. и доп. / Н. В. Медуницын – М.: Трида-Х, 2004. – 448 с.
3. Адъюванты при конструировании ассоциированных вакцин против инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота / Красочко, П. А. [и др.] // Ветеринарная биотехнология. – 2019. – № 35. – С. 90–99.
4. Михалишин, В. В. Адъюванты и их использование / В. В. Михалишин, Н. С. Мамков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008. – Т. 6. – С. 340–371.
5. Addition of saponin to double oil emulsion FMD vaccines enhances specific antibody responses in cattle and pigs / E. Smitsaart, A. M. Espinoza, R. Sanguinetti [et al.] // Europ. Commis. Control FMD. Sess. Ress. Group Stand. Techn. Comm. – Chania, Grete, 2004. – P. 344–351.
6. Адъюванты при конструировании ассоциированных вакцин против инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота / Красочко П. А. [и др.] // Ветеринарная биотехнология. – 2019. – № 35. – С. 90–99.
7. Воробьев, А. А. Анатоксины / А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев, А. Т. Кравченко. – Москва: Медицина, 1965. – 488 с.