

УДК 619:[578.834.1+579.843.95]:636.934.57

Каяк Ю.А., аспирант

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь***ПОДБОР АДЬЮВАНТОВ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ
ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ,
ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ SARS-CoV-2, И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА НОРОК****Резюме**

В статье приведены результаты испытаний лабораторных образцов вакцины «Ковпаст» на лабораторных животных в процессе подбора оптимальных адъювантов при конструировании биопрепарата. Установлено, что при разработке вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, и пастереллеза норок более высокие показатели иммуногенности были получены при применении геля гидрата окиси алюминия в 15%-ной концентрации и при соотношении пастереллезного и коронавирусного компонентов 1:2.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, пастереллез, адъюванты, образцы вакцин, кролики, антигены, антитела, иммуногенная активность.

Summary

The article presents the results of testing laboratory samples of the «Kovpaste» vaccine on laboratory animals in the process of selecting optimal adjuvants when constructing a biopreparation. 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 were obtained when using aluminum hydroxide gel at a 15 % concentration and a ratio of pasteurellosis and coronavirus components of 1:2.

Keywords: coronavirus infection, SARS-CoV-2, pasteurella, adjuvants, vaccine samples, rabbits, immunogenic activity.

Поступила в редакцию 14.05.2025 г.

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 концентрации и очистки от примесей применяют центрифугирование.

Для повышения эффективности вакцины в инактивированную вирусную суспензию добавляют адъюванты, что позволяет получить высокоактивный препарат. В зависимости от вида животных, их возраста, пола и технологии содержания, как правило, предполагается иммунитет 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.

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 Al

РО4. 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 введен 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 его канцерогенных свойств. Вакцины на основе водно-масляной эмульсии обычно вводят животным внутримышечно. Метаболические особенности минерального масла обуславливают длительное удержание капель эмульсии с антигеном в месте инъекции.

В целях компенсации ограничений минеральных адъювантов в качестве альтернативы были исследованы растительные масла. 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.

В особенности это относится к высокореактогенному препарату «Маркол». Аналогичная ситуация наблюдается с монтанидами (например, ISA 70 и др.), 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 (дозировка, место введения и др.), а также от правильного выбора и использования неспецифических стимуляторов иммуногенеза – адъювантов.

Эффективность адъювантов определяется исходным иммунным статусом организма до вакцинации. Адъюванты модифицируют кинетику развития иммунного ответа, ускоряя его наступление, повышая интенсивность и продлевая продолжительность [2, 3].

Подбор адъюванта для конкретной вакцины должен основываться на тщательном анализе соотношения потенциальной пользы от усиления иммуногенности вакцины с риском возникновения местных и

системных реакций [4]. Необходимо учитывать, что применение повышенных доз адъювантов может привести к иммуносупрессии. При использовании низких доз наблюдается кратковременный пик концентрации иммуноглобулинов, не превышающий 2-3 месяцев [5].

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).

Целью исследования являлся подбор оптимальных адъювантов при конструировании инактивированной вакцины для профилактики коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, и пастереллеза норок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по подбору оптимального адъюванта для вакцины «Ков-паст», предназначенной для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, и пастереллеза норок, проводились в отделе вирусных инфекций и виварии РВП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского» и РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

При конструировании лабораторных образцов вакцины с различными адъювантами вначале готовили коронавирусный и пастереллезный компоненты.

Культивирование коронавируса (изолят SARS-CoV-2 № 1/3947) осуществлялось на культуре клеток Vero E6 в питательной среде ДЕМ 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 Sartocoon Slice 200 ECO с размером пор 300 кДа.

Получение биомассы *P. multocida* (серовары 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* (серовары А и В) формалином в концентрации 0,5 %, была определена концентрация взвесей, которая впоследствии была доведена до необходимых 6,0 ед. с помощью денситометра по МакФарленду, что соответствовало концентрации около 2 млрд/см³. Инактивированные культуры *P. multocida* обоих сероваров были смешаны в стерильном флаконе в соотношении 1:1.

Лабораторные образцы вакцины были получены путем смешивания культуры коронавируса SARS-CoV-2 и смеси бульонных культур *Pasteurella multocida* (серовары А и В) в соотношении вирусного и бактериального антигенов 2:1 в одном стерильном флаконе. Затем эту смесь разделили на три равные части и поместили их в три стерильных флакона, в которые асептически добавили три разных адъюванта.

В первом лабораторном образце в качестве адъюванта использовался 10%-ный стерильный раствор алюмокалиевых квасцов в качестве адъюванта. Его добавляли в количестве 5 % от общего объема препарата.

Во втором образце биологического препарата в качестве адъюванта был использован гель гидроокиси алюминия. В антигенную составляющую препарата был добавлен стерильный гель ГОА в объемной концентрации 15 %.

В третьем лабораторном образце вакцины использовался «Montanide ISA 15A VG» в соотношении 15 % к антигенной части (по объему). Соединение компонентов проводилось при комнатной температуре 18–24 °С. При этом адъювант добавлялся в антигенную часть постепенно, с перемешиванием со скоростью 100 об/мин в течение 5–7 мин. Все манипуляции проводились в стерильном боксе с использованием стерильной посуды. В результате была получена эмульсия антигена типа «масло в воде».

Было получено 120,0 мл (доз) лабораторного образца вакцины в трех вариан-

тах (3 флакона по 40,0 см³ препарата в каждом). Флаконы были герметично закрыты резиновыми пробками и обжаты алюминиевыми колпачками. На флаконы наклеивались этикетки с соответствующими обозначениями.

Биопрепараты хранились при температуре от 2 °С до 8 °С.

Оценку безвредности изготовленных лабораторных образцов вакцины проводили путем однократного подкожного введения в дозе 0,5 см³ 30 белым мышам массой 18–20 г. Для каждого образца использовали по 10 животных. Наблюдение за ними осуществлялось в течение 10 дней.

Реактогенность вакцины оценивалась на 9 кроликах массой 2,5–3 кг после однократного внутримышечного введения в дозе 1,0 см³. Каждый образец вакцины применяли 3 кроликам. Наблюдали за животными в течение 10 дней, при этом изучалось как общее состояние животных, так и реакция на месте инъекции. В случае отсутствия каких-либо клинических признаков заболевания и местных реакций на введение препарата по истечении срока наблюдения образец считался неактогенным.

Стерильность вакцины проверялась методом посева на питательные среды в соответствии с требованиями ст. 2.6.1 [6]. Отсутствие роста микрофлоры в посевах вакцины подтверждало ее стерильность.

Для исключения ложноположительного результата из-за помутнения среды (опалесценция) на 3-й день культивирования дополнительно по образцу с монтанидом проводился пересев в количестве 0,1 см³ из бульонной среды предыдущего посева на аналогичную бульонную среду.

Культивирование посевов проводилось в течение 10 суток, дополнительного посева – в течение 7 суток. В этот же период осуществлялся мониторинг роста или его отсутствия.

После подтверждения стерильности, безвредности и ареактогенности трех лабораторных образцов вакцины с различными адъювантами были проведены дальнейшие исследования.

Для оценки иммуногенной активности трех образцов вакцины были созданы 3 опытные группы по 3 кролика в каждой. Еще 3 кролика служили контролем. Образцы вакцины вводили кроликам опытных

групп однократно внутримышечно в область бедра в объеме 1,0 см³. Животным контрольной группы вводили стерильный изотонический раствор (СИР) – 0,85%-ный раствор натрия хлорида с добавлением 15 % по объему геля ГОА внутримышечно в область бедра в этой же дозе.

До вакцинации и на 21-е сутки после нее у опытных животных отбирали пробы крови для получения сывороток. Пробы сывороток всех опытных кроликов до иммунизации и после исследовали в реакции агглютинации с антигенами штаммов *Pasteurella multocida* сероваров А и В.

Коронавирусные титры специфических антител выявляли в реакции нейтрализации.

Уровень специфических антител в опытных группах кроликов к *P. multocida* сероваров А и В в реакции агглютинации 1:16 и выше считался защитным по отношению к возбудителю пастереллеза.

Титры вируснейтрализующих антител 3 log₂ и более рассматривались как достаточный уровень для обеспечения защиты от коронавирусной инфекции.

На основании проведенных исследований определились с составом антигенных компонентов вакцины, выбором адъюванта и дозировок при иммунизации лабораторных животных.

Для оценки оптимального соотношения вирусного и бактериального компонентов изготовили два образца вакцины следующего состава: антиген штамма коронавируса SARS-CoV-2 + антиген *Pasteurella multocida* (серовар А) в соотношении 2:1 и 1:1 с добавлением в качестве адъюванта геля гидроокиси алюминия.

Испытания по оптимальному соотношению антигенов проводили на кроликах живой массой 2,5–3,0 кг. Было сформировано 3 группы – 2 опытные и 1 контрольная по 3 головы в каждой. Животным опытных групп вводили образцы вакцины однократно внутримышечно в область бедра в объеме 1,0 см³. Контрольным животным вводили стерильный изотонический раствор (0,85%-ный раствор натрия хлорида) с добавлением геля гидроокиси алюминия (15 % по объему) внутримышечно в область бедра в такой же дозе.

До вакцинации и на 21-е сутки после нее у привитых животных отбирали

кровь для получения сывороток. Пробы сывороток крови всех опытных кроликов после иммунизации исследовали в реакции агглютинации с пастереллезным антигеном (штамм *Pasteurella multocida* серовара А). Антикоронавирусные титры иммуноглобулинов выявляли в реакции нейтрализации. Оценку проводили по уровню специфических антител через 21 день после иммунизации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При исследовании 3 лабораторных образцов вакцины «Ковпаст» с разными адьювантами после посева проб вакцины на питательные среды роста микроорганизмов обнаружено не было.

Таблица 1 – Иммуногенная активность лабораторных образцов вакцины с разными адьювантами

Группы	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	Контроль
№ образца (адьювант)	образец № 1 (алюмокалиевые квасцы)	образец № 2 (ГОА)	образец № 3 (масляный)	СИР + ГОА
Титры антибактериальных антител, $\log_2$	5,3±0,2	6,0±0	6,0±0	2,0±0
Титры противовирусных антител, $\log_2$	3,67±0,2	4,0±0	3,0±0	0

В результате проведенных исследований установлено, что у 80 % вакцинированных животных в реакции агглютинации титр специфических антител к *P. multocida* серовара А составлял не менее 1:16. Фоновые титры антител при этом не превышали 1:4 у контрольных и опытных кроликов до иммунизации.

При постановке реакции агглютинации с антигеном *P. multocida* серовара В наблюдалась частичная самоагглютинация приготовленного антигена, что в значительной степени затрудняло учет реакции. В связи с этим данный штамм в последующих экспериментах был исключен из состава вакцины.

У опытных кроликов до вакцинации и у контрольных животных антитела к ан-

Во время опыта после введения биопрепаратов признаки заболевания у животных отсутствовали. Изменений в их клиническом состоянии не наблюдалось: животные сохраняли активность и аппетит. На месте введения отеков, некрозов, припуханий тканей, очагов флюктуации не обнаружено.

Вначале при конструировании вакцины использовалось соотношение коронавирусных и пастереллезных антигенов 2:1.

Данные результатов исследований оценки иммуногенных свойств лабораторных образцов вакцины представлены в таблице 1.

тигену вируса SARS-CoV-2 в реакции нейтрализации не выявлялись. У иммунизированных животных титры противовирусных антител на 21-й день исследований были на уровне от 1:8 до 1:16, что свидетельствовало о значительной иммуногенной активности штамма SARS-CoV-2.

Более высокий показатель иммуногенности был у образца вакцины с гелем ГОА в качестве адьюванта. Уровень противопастереллезных антител при этом составлял 6 $\log_2$, противокоронавирусных – 4 $\log_2$.

Результаты опыта по изучению оптимального соотношения вирусного и бактериального антигенов (коронавирусных и пастереллезных) в соотношении 1:1 и 2:1 в составе вакцины представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Иммуногенная активность лабораторных образцов вакцины «Ковпаст» при разных соотношениях вирусного и бактериального антигенов

Группы	1-я опытная	2-я опытная	Контроль
Соотношение монокомпонентов	2:1	1:1	СИР + ГОА
Титр антибактериальных антител, $\log_2$	5,0±0	4,67±0,2	1,67±0,2
Титр противовирусных антител, $\log_2$	4,0±0	3,67±0,2	0

Результаты опыта показали, что оптимальным является соотношение вирусного и бактериального антигенов 2:1. Его применение позволяет обеспечить выработку специфических антител в титрах на $0,2-0,4 \log_2$ выше в сравнении с образцом с соотношением моноконпонентов 1:1.

Таким образом, лабораторные образцы вакцины, предназначенные для вакцинации норок в неблагополучных по коронавирусной инфекции и пастереллезу звероводческих хозяйствах, являются стерильными, безвредными, ареактогенными и иммуногенными.

Анализ уровня специфических иммуноглобулинов в сыворотке крови привитых животных указывает на выраженную динамику образования антител к обоим компонентам вакцины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя данные серологических исследований сывороток крови кроликов, иммунизированных вакциной «Ковпаст», установлено, что все исследуемые адъюванты оказывают положительное влияние на синтез специфических антител.

При подборе оптимального адъюванта при изготовлении вакцины «Ковпаст» более высокие показатели иммуногенности были получены при применении адъюванта гидроксал (гель гидроокиси алюминия).

Общих и местных изменений в клиническом состоянии животных после введения трех вариантов биопрепарата, а также аллергических реакций не выявлено. На протяжении всего опыта животные сохраняли активность и аппетит; болезненности, отека, воспалительных реакций на месте введения образцов вакцины не наблюдалось.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Красочко, П. А. Современные подходы к классификации иммуномодуляторов / П. А. Красочко // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2006. – № 2. – С. 35–40.
2. Адъюванты при конструировании ассоциированных вакцин против инфекционных энтеритов молодняка крупного рогатого скота / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарная биотехнология. – 2019. – № 35. – С. 90–99.
3. Михалишин, В. В. Адъюванты и их использование / В. В. Михалишин, Н. С. Мамков // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2008. – Т. 6. – С. 340–371.
4. 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.
5. Воробьев, А. А. Анатоксины / А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев, А. Т. Кравченко. – М. : Медицина, 1965. – 488 с.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» ; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Изд. II. – Молодечно : Победа. – Т. 1 : Общие методы контроля лекарственных средств. – 1220 с.

ВАКЦИНА ИНАКТИВИРОВАННАЯ ЭМУЛЬГИРОВАННАЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ КОЛИБАКТЕРИОЗА (ЭШЕРИХИОЗА) И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

КОЛИТОКС-ЛТ

► изготовлена из штаммов бактерий *Escherichia coli* серотипов F41, K88 (F4), K99 (F5), A20 (F17); *Klebsiella pneumoniae*; рекомбинантной субъединицы В термолabile токсина *Escherichia coli*; масляного адъюванта



► термолabile энтеротоксин *E. coli* имеет белковую природу и обладает высокой иммуногенной активностью

► для иммунизации глубокостельных коров, нетелей и телят в неблагополучных и угрожаемых по колибактериозу и клебсиеллезу хозяйствах

WWW.BIEVM.BY