

С-х. животных. – 2005. – № 10. – С. 71-74. 3. Новиков, В.А. Тяжелые металлы – техногенный фактор воздействия на окружающую среду и животных / В.А. Новиков, А.В. Иванов, М.Я. Тремасов // Ветеринарный врач. – 2002. – № 4. – С.45-50. 4. Федоров, Л.А. За химическую безопасность / Федоров Л.А // Посев. – 2000. – №2. – С. 21-24.

INFLUENCE THE DIOXIN AND CADMIUM OF THE CHLORIDE ON NATURAL RESISTANCE OF ANIMAL

Vafin I.F., Papunidi K.Kh., Novikov V.A.

Federal Center of Toxicological and Radiotional Safety of Animals, Kazan

Peroralinoe daily introduction white rat during 30 day dioxin in dose 1/200 LD50 and cadmium of the chloride in dose 1/20 LD50 causes heavy poisoning and ruin 83% animal.

УДК 619:616.98:578.831:616-078.33.

ИММУНОГЕННОСТЬ МУКОЗАЛЬНЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ

Волкова М.А., Рунина И.А., Ирза А.В., Чвала И.А., Фролов С.В., Долгов Д.Л.,

Чубукова Е.И., Борисов В.В., Мудрак Н.С., Дрыгин В.В.

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

В настоящее время в промышленном птицеводстве для профилактических целей широко используются живые и инактивированные вакцины, которые значительно снижают клиническое проявление многих инфекционных болезней птиц. В плане повышения эффективности и упрощения техники применения иммунологических препаратов в последние годы разрабатываются новые типы вакцинных препаратов. Одним из перспективных направлений являются мукозальные вакцины, главными компонентами которых являются специфический антиген и природные или синтетические вещества, обладающие мукоадгезивной активностью, вводимые интраназально или перорально. В качестве мукозальных адьювантов с положительным результатом испытывались такие вещества как – хитозан, являющийся природным биополимером и частицы фосфата кальция, представляющие из себя неорганическую конструкцию (САР) [3, 4]. Мукозальные вакцины обладают дополнительными свойствами по сравнению с традиционными вакцинами, так как они индуцируют и местную защиту слизистых оболочек, и системный иммунитет [2, 3, 4]. Эффективность мукозальных вакцин можно оценить в экспериментальных условиях с использованием серологических методов и по защите птиц от контрольного заражения.

Целью нашей работы было изучение иммунного ответа цыплят после интраназального введения вакцинных препаратов против ньюкаслской болезни (НБ), содержащих в качестве адьювантов САР-частицы и хитозан и их защиты при контрольном заражении высоковирулентным вирусом НБ в разные сроки после иммунизации.

Материалы и методы. *Вакцины.* 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). Концентрация АГ ВНБ, определенная в блокирующем варианте иммуноферментного анализа, составляла не менее 1:4096.

Было изготовлено 3 вакцинных препарата. Приготовление мукозальных адьювантов, 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].

Третий вакцинный препарат готовили простым смешиванием равных объемов антигена вируса НБ и фосфатно-буферного раствора (ФБР).

Последовательность в компоновке вакцинных препаратов осуществляли в соответствии с вышеописанными методиками, но с таким расчетом, чтобы количество АГ ВНБ в прививном объеме (0,2 см³) было одинаковым для всех конструкций препаратов.

Эксперимент на животных. Были сформированы 4 опытные группы из 20-суточных цыплят по 25 голов в каждой. Цыплят 1-3 опытных групп иммунизировали интраназально трёхкратно с интервалом в 5 сут образцами вакцин в объеме 0,2 см³. Цыплята 4 группы оставались интактными и служили в качестве отрицательного контроля. Отбор проб сывороток крови и секреторных жидкостей (трахеальных смывов и слезной жидкости) от цыплят проводили до иммунизации и через 2, 4, 6 и 8 недель после последней (третьей) иммунизации. Контрольное заражение цыплят высоковирулентным изолятом вируса НБ Ск/Rus/Amursky/1057/06 с индексом интрацеребральной патогенности (ICPI), равным 2,0, проводили через 1, 2, 3 и 4 недели после 3 вакцинации. Заражение цыплят проводили путём внутримышечного введения в область бедра вирусосодержащей суспензии с титром 6,0 lg ЭИД_{50/см³} в объёме 0,5 см³.

Непрямой вариант ИФА. ИФА для определения титра иммуноглобулинов классов А, М и G в сыворотках крови и секреторных жидкостях цыплят проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями [1]. Титр антител в испытуемых пробах определяли по конечной точке титрования.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). 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.

Результаты и обсуждение. Изучали влияние на иммунный ответ у цыплят САР-частиц и частиц на основе хитозана, используемых в качестве мукозальных адьювантов при введении с инактивированным вирусом НБ.

Иммуногенную и протективную активность мукозальных вакцинных препаратов исследовали комплексно с использованием двух серологических тестов и проведения контрольного заражения. Для более полной характеристики эффективности таких вакцин исследовали три вида проб биологического материала: сыворотки крови, трахеальные смывы и слезную жидкость.

В табл. 1 представлены результаты исследования сывороток крови в РТГА, из которых следует, что у цыплят, иммунизированных мукозальными вакцинными препаратами, максимальное количество специфических антител выявляли через 2 недели, а у иммунизированных антигеном с ФБР – через 4 недели после вакцинации. В группе цыплят, вакцинированных препаратом с хитозаном, количество положительных проб было выше, чем в группах, вакцинированных препаратом с САР-частицами и антигеном без адьюванта в течение 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 ВНБ в РТГА (log ₂)				
	До вакцинации	Срок после последней иммунизации, нед.			
		2	4	6	8
АГ ВНБ+САР	2 (0,5) 0/10*	4,1 (0,3) 7/10*	3 (0,6) 5/10	1,8 (0,8) 1/5	3,4 (0,6) 1/5
АГ ВНБ+хитозан		5,1 (0,4) 9/10	3,9 (0,3) 8/10	2,8 (0,8) 4/5	3,4 (0,6) 2/5
АГ ВНБ+ФБР		3,3 (0,5) 6/10	3,6 (0,9) 6/10	1,7 (1,2) 1/5	1,7 (0,7) 0/5
Контроль		<1 0/10	<1 0/10	<1 0/5	<1 0/5

Примечание: * - положительные пробы/общее количество проб; АГ – антиген

На рис. 1 представлены результаты исследования в ИФА сывороток крови цыплят, иммунизированных мукозальными вакцинами, из которых следует, что пик IgM-антител наблюдали через 2 недели после третьей вакцинации во всех вакцинированных группах, а IgG через 2 недели в группах, иммунизированных вакциной с хитозаном, и через 4 недели у птиц, привитых вакциной с САР-частицами и АГ ВНБ с ФБР.

Самые высокие уровни сывороточных IgM и IgG-антител наблюдали у цыплят, иммунизированных вакциной, содержащей в качестве адъюванта хитозан.

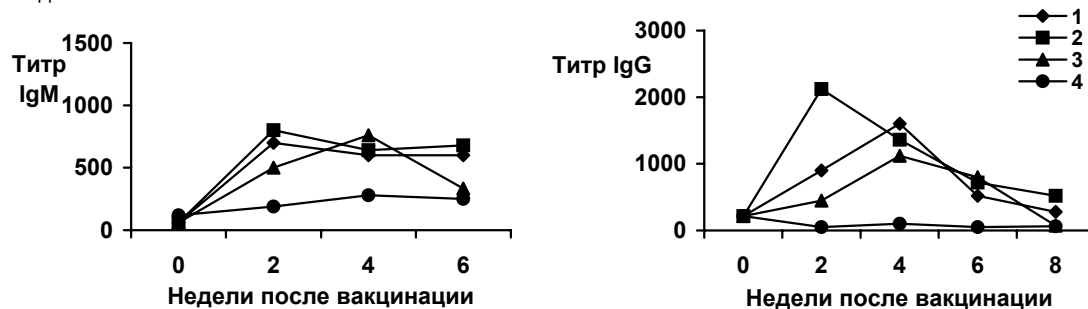


Рис. 1 Иммуногенная активность мукозальных препаратов при исследовании сывороток крови методом ИФА

Примечание: 1- АГ ВНБ+САР, 2 -АГ ВНБ+хитозан, 3 - АГ ВНБ+ФБР, 4 – не вакцинированные; титр иммуноглобулинов выражен величиной, обратной разведению сыворотки.

На рис. 2 представлены результаты исследования IgA, IgM и IgG в трахеальных смывах и в слезной жидкости методом ИФА. Максимальное количество антител в трахеальных смывах выявляли через 2 недели, а в слезной жидкости через 4 недели после последней вакцинации. Через 8 недель после вакцинации IgA в мукозальных пробах не выявляли, а уровень IgG был выше в пробах от цыплят, вакцинированных препаратом с хитозаном.

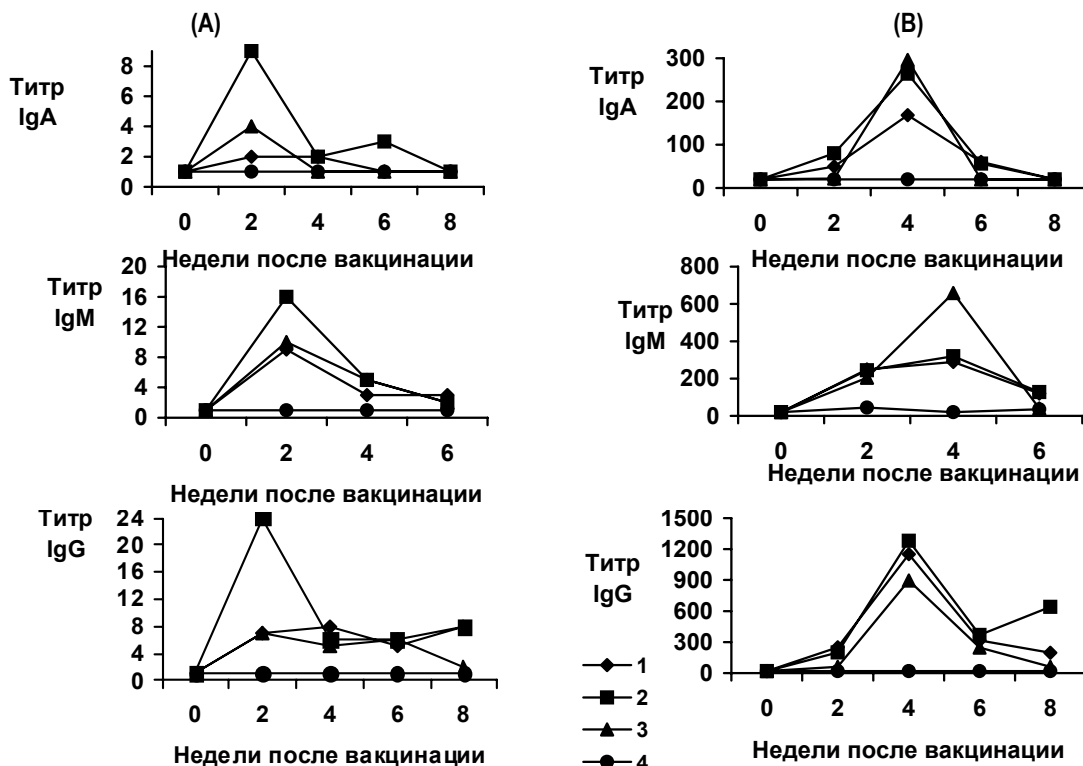


Рис. 2 Иммуногенная активность мукозальных препаратов при исследовании трахеальных смывов и слезной жидкости методом ИФА

Примечание: 1- АГ ВНБ+САР; 2 - АГ ВНБ +хитозан; 3 - АГ ВНБ +ФБР; 4 – не вакцинированные; (А) – трахеальные смывы; (В) – слезная жидкость; титр иммуноглобулинов выражен величиной, обратной разведению пробы секреторной жидкости

Розділ 5. Імунологія

Для определения протективных свойств экспериментальных вакцин провели контрольное заражение цыплят высоковирулентным вирусом НБ в разные сроки после выполнения схемы вакцинации. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2 – Протективная активность мукозальных вакцин против НБ

Вакцина	Клинические признаки НБ					Специфическая гибель от НБ				
	7*	14	21	28	56	7	14	21	28	56
АГ ВНБ+САР	2/5**	1/5	1/5	0/5	2/5	2/5	2/5	0/5	1/5	2/5
АГ ВНБ+хитозан	1/5	1/5	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	0/5	0/5	1/5
АГ ВНБ+ФБР	1/5	2/5	0/5	1/5	2/3	5/5	3/5	0/5	2/5	1/3
Контроль	1/5	5/5	2/5	1/5	4/4	5/5	5/5	5/5	5/5	4/4

Примечание: * – сутки после иммунизации, в которые проведено заражение; ** - в числителе – количество цыплят с проявлением признаков НБ, в знаменателе - общее количество экспериментальных цыплят после контрольного заражения

Из результатов, представленных в табл. 2, видно, что мукозальные вакцины создавали у цыплят определенный уровень специфической защиты от контрольного заражения вирулентным вирусом НБ. Причем можно отметить, что сроки формирования защиты, вызванной мукозальными препаратами, были более короткими, а её продолжительность была более длительной.

Контрольное заражение птиц, проведённое через 7 суток после иммунизации, приводило к гибели всех цыплят в контрольной группе и группе, иммунизированной антигеном без адьюванта. У цыплят, иммунизированных мукозальными вакцинами (АГ ВНБ + САР и АГ ВНБ + хитозан), был отмечен падеж двух цыплят из пяти в каждой группе с проявлениями специфических клинических признаков НБ. При заражении птиц через 14 суток после иммунизации также отмечали специфическую гибель части цыплят в опытных группах. Полную защиту цыплят от вирулентного вируса регистрировали во всех опытных группах при заражении на 21 сутки после вакцинации. К введению вирулентного вируса НБ на 28 сутки после иммунизации были устойчивы цыплята из группы, привитой вакциной с хитозаном. В группах, иммунизированных вакциной с САР-частицами и АГ ВНБ, наблюдали гибель 1 и 2 цыплят, соответственно. После заражения на 56 сутки после иммунизации один цыплёнок пал с признаками специфического заболевания в группе, привитой вакциной с хитозаном и два – в группе, привитой вакциной с САР-частицами. В группе, иммунизированной антигеном с ФБР, наблюдали гибель одного цыплёнка из трёх, у двух цыплят наблюдали специфические клинические признаки НБ.

Из полученных результатов следует, что мукозальная вакцина против НБ с хитозаном создавала самый высокий уровень защиты цыплят от заражения вирулентным вирусом НБ.

Выводы. Комплексные исследования иммунного ответа цыплят на интраназальное введение экспериментальных мукозальных вакцин против НБ показали, что наиболее сильный гуморальный и мукозальный иммунный ответ был получен при введении цыплятам вакцин, содержащих хитозан. При исследовании протективной активности мукозальная вакцина с хитозаном обеспечила формирование защиты у цыплят против ньюкаслской болезни в более ранние сроки по сравнению с другими испытанными образцами вакцин.

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.

IMMUNOGENICITY OF MUCOSAL VACCINES AGAINST NEWCASTLE DISEASE

M.A. Volkova, I.A. Runina, A.V. Irza, I.A. Chvala, S.F. Frolov, D.L. Dolgov, Ye.I. Chubukova, V.V. Borisov, N.S. Mudrak, V.V. Drygin

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

The dynamics of the immune response induction in 20-day-old chicks following triple intranasal administration of experimental samples of Newcastle disease vaccines with potassium phosphate nanoparticles (CAP) and chitosan was studied. The efficacy of vaccines was evaluated comprehensively using ELISA and HIT and challenge. The chitosan-based vaccine had the highest antigenic and protective activity.