

УДК 579.871.1:615.371:616-097

**АНТИГЕННІ ТА АД'ЮВАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ПРЕПАРАТІВ
СУБКЛІТИННИХ КОМПЛЕКСІВ ЗБУДНИКА
ДИФТЕРІЇ ПРИ ЩЕПЛЕННІ ЛАБОРАТОРНИХ
ТВАРИН**

Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Ждамарова Л.А., Белозерський В.І., Скляр Н.І., Колпак С.А., Бобирєва І.В.

ДУ «ІМІ мікробіології та імунології ім.
І.І.Мечникова АМН України»

Уроки останньої епідемії дифтерії в країнах Східної Європи в 90-ті роки минулого сторіччя свідчать про збереження резервуару інфекції в сучасному соціумі, в тому числі й в Україні, і вимагають від вчених подальших зусиль для пошуку шляхів підвищення ефективності вакцинопрофілактики цієї небезпечної інфекції [1-4]. Оскільки антитоксичний імунітет не перешкоджає носійству токсигенних коринебактерій дифтерії, їх інвазії та перебуванню в організмі людини, одним з перспективних напрямків можна вважати можливість запобігання бактеріоносійству коринебактерій дифтерії шляхом утворення достатнього рівня антибактеріального імунітету. Експериментальні дослідження, проведені в МНДІЕМ ім. Г.М. Габричевського, обґрунтували саме необхідність пошуку бактеріальних антигенів, відповідальних за формування резистентності організму до інвазії збудника та ефективність імуномодуючої дії вакцини, одержаної з відповідних мікробних фракцій [5-10]. Протимікробний дифтерійний імунітет вивчали також інші дослідники [11-13].

Проведені нами дослідження спрямовані на розробку підходів до удосконалення вакцинних препаратів проти дифтерії, які б впливали не лише на формування антитоксичного імунітету, а й на підвищення протибактеріального імунітету як фактору локалізації дифтерійної інфекції в організмі [14].

Для одержання нативних антигенів збудника дифтерії застосовувалися фізико-хімічні чинники. На першому етапі досліджень був визначений найбільш перспективний режим ультразвукової дезінтеграції мікробних клітин *C. diphtheriae*, використання хімічних речовин, ультрафільтрації для одержання антигенних препаратів, які потенційно можуть мати ефективні імуногенні та ад'ювантні властивості. Одержані експериментальні зразки препаратів антигенних фракцій *C. diphtheriae* були охарактеризовані за їх хімічною структурою та молекулярною масою [15].

Другий етап досліджень був присвячений вивченню антигенних та ад'ювантних властивостей зразків препаратів субклітинних комплексів.

Матеріали і методи

Досліджувались шість серій мікробних дезінтегратів та супернатантів і дві серії препаратів клітинних

стінок *C. diphtheriae*, одержаних за принциповою схемою, наведеною у попередній статті [15].

Методики їх виготовлення варіювались у відношенні послідовності етапів, їх тривалості, застосування в процесі екстрагування 20 % розчину натрію хлориду, охолодження та обробки ультразвуком низької або середньої частоти.

Крім того під час дослідів використовувалась урита формаліном бактерійна дифтерійна вакцина, яку виготовили наступним чином. Добову агарову культуру *C. diphtheriae*, вирощену на агарі з додаванням 5 % людської крові, змивали фізіологічним (0,9 %) розчином натрію хлориду (NaCl), тричі відмивали її та суспендували в концентрації, яка відповідає 100 млрд. мікробних тіл за оптичним стандартом ДІСК ім. Тарасевича. Потім ватно-марлеву пробку змочували у 40 %-му формаліні та перекривали флакон із мікробною суспензією, зверху пробку закривали поліетиленом для запобігання випаровування формаліну назовні. Флакон витримували у термостаті при температурі 37 °C впродовж 3 діб, а потім міняли пробку на суху стерильну і витримували у термостаті ще 3 діб. Після цього робили висів на 5 %-ий кров'яний агар та бульйон Мартена або Лінгуд для перевірки відсутності росту культури *C. diphtheriae*.

Вивчення впливу досліджуваних вакцинних препаратів на формування антитоксичного протидифтерійного імунітету проводилося на 40 кролях середньою вагою до 3 кг.

Схеми імунізації подано в таблицях 2,3,4,5 та 6.

Результати і обговорення

Мікробну масу виробничого токсигенного штаму *C. diphtheriae*, яку використовували для виготовлення антигенних препаратів субклітинних комплексів збудника дифтерії перед початком дезінтеграції тричі відмивали фізіологічним розчином від дифтерійного токсину. Проте доцільно було перевірити також можливий вплив залишкових, малих концентрацій токсину на процес формування антитоксичного імунітету при імунізації кролів.

Для того, щоб визначитися з дозами дифтерійного токсину для щеплення, спочатку перевірили його токсичну дію на нейтрофіли крові людини *in vitro* за допомогою визначення показника пошкоджених нейтрофілів (ППН) (табл. 1).

Виявилось, що зі збільшенням розведення токсину від 1:10 до 1:100 000 спостерігається тенденція до зменшення ППН від 0,05 до 0,02.

Надалі з'ясовували вплив субтоксичних доз нативного дифтерійного токсину (в розведеннях від 1:100 до 1:10 000) на динаміку титрів протидифтерійних антитоксичних антитіл при імунізації кролів очищеним концентрованим (несорбованим на гідроксиді алюмінію) дифтерійним анатоксином (АД). В таблиці 2 наведений склад експериментальних вакцинних препаратів, який передбачував поєднання 1,0 мл (20 Лф) АД з 0,4 (0,8) мл дифтерійного токсину.

Таблиця 1. Результати вивчення токсичної дії нативного дифтерійного токсину, взятого у високих розведеннях, на нейтрофіли крові людини

№№ п/п	Титр токсину, Lf/мл	Розведення токсину	ППН
нерозведений токсин	150	–	–
O ₁	15	1 : 10	21 % (0,05)
O ₂	1,5	1 : 100	19 % (0,03)
O ₃	0,15	1 : 1000	19 % (0,03)
O ₄	0,015	1 : 10 000	18 % (0,02)
O ₅	0,0015	1 : 100 000	18 % (0,02)
Контроль 1	мазок крові	–	–
1	2	3	4
Контроль 2	кров + фізіологічний розчин	–	16 %

Таблиця 2 – Результати вивчення впливу дифтерійного токсину, взятого у високих розведеннях, на формування антитоксичного імунітету до дифтерії при комбінованому (парентеральному та пероральному) щепленні кролів очищеним концентрованим (несорбованим) дифтерійним анатоксином

№№ кролів	К	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅
Вакцини, введені п/ш під час вакцинації	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,4 мл дист. води	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,4 мл дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,4 мл дифт. токсину (1:1000)	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,4 мл дифт. токсину (1:10000)	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,4 мл дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (20 Lf) АД + 0,8 мл дифт. токсину (1:100)
Рівень антитоксинів на 1-4-му тижні, МО/мл	0 0,03 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0,03 0 0 0	0,03 0,03 0,03 0
Вакцини, введені через місяць per os під час ревакцинації	1,0 мл (600 Lf) АД + 0,4 мл дист. води	1,0 мл (100 Lf) АД + дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (200 Lf) АД + дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (300 Lf) АД + дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (60 Lf) АД + дифт. токсину (1:100)	1,0 мл (20 Lf) АД + дифт. токсину (1:100)
Рівень антитоксинів на 1-5-му тижні, МО/мл	0 0 0 0 0	2,0 16,0 2,0 2,0 2,0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0	0 0 0 0 0

З даних, наведених в таблиці 2, видно, що з шести вакцинованих кролів в однієї тварини після пероральної ревакцинації спостерігалася виражена динаміка титрів протидифтерійних антитоксинів, тоді як всі інші не відреагували на щеплення продукцією антитоксичних антитіл. Слід зауважити, що ця тварина, у відмінність від інших, імунізованих вперше, в минулому році вже отримувала щеплення проти дифтерії: спочатку їй було введено 500 Lf АД перорально дробово, але сероконверсія не відбулася; та через місяць – ще 0,5 мл (5 Lf) АД п/ш, що призвело до підйому титрів РПГА на третьому тижні до 2,0 МО/мл. І хоча цього року напередодні експерименту тварина мала нульові титри, комбінована бустер-імунізація дала високий рівень специфічного імунітету – до 16,0 МО/мл на другому тижні й 2,0 МО/мл на четвертому після перорального щеплення.

Та взагалі отримані результати не дали підстав для твердження про будь-який суттєвий вплив малих

концентрацій дифтерійного токсину на формування рівня антитоксичних антитіл в піддослідних тварин.

Подальше визначення антигенних та ад'ювантних властивостей досліджуваних препаратів субклітинних комплексів проводилося з використанням трьох принципових схем парентеральної імунізації піддослідних кролів, в тому числі були випробувані наступні варіанти (табл. 3): (1) тварини одержували підшкірно (п/ш) очищений концентрований (несорбований) дифтерійний анатоксин в поєднанні з мікробним дезінтегратором (ДЗ), препаратами клітинних стінок збудника дифтерії (кл. ст.) або супернатантом (СН), що містив розчинні антигени; (2) вводились антигенні препарати субклітинних комплексів з додаванням гелю гідроксиду алюмінію; (3) щеплення проводилося вбитою формаліном цільноклітинною дифтерійною вакциною.

В таблиці 3 представлені дані про щотижневий рівень титрів антитоксичного дифтерійного імунітету впродовж місяця після імунізації (варіант 1).

Таблиця 3 – Динаміка рівня гуморального імунітету проти дифтерії (за даними РПГА) в сироватках крові кролів після їх парентеральної імунізації досліджуваними антигенними препаратами

№№ кролів	Склад вакцини	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
1	п/ш 0,4 мл ДЗ II 7 h (1:1000) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,5	16,0	16,0
2	п/ш 0,4 мл СН (1:2000) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,03	0	0,03
3	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер.1 + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0	0	0
4	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер.2 + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0,5	1,0	0,25
5	п/ш 1,0 мл ДЗ II 7 h (1:1000) + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0	0	0
6	п/ш 1,0 мл СН (1:2000) + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0,03	0	0
7	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.1 + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0	0	0
8	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.2 + 0,4 мл гель $Al_2(OH)_3$	0	0,03	0	0,03
9	п/ш 0,4 мл ДЗ II 7 h (нерозв.) + 1,0 мл АД (20 Lf)	>256,0	>256,0	>256,0	>256,0
10	п/ш 0,4 мл СН (1:2) + 1,0 мл АД (20 Lf)	0,5	4,0	2,0	2,0
11	п/ш 1,0 мл ДЗ II 7 h (нерозв.)	0,125	0,06	16,0	0,03
12	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.1	0	0,03	0	0
13	п/ш 1,0 мл кл. ст., сер.2	0	0,03	0	0
14	п/ш 0,4 мл СН ₁ II + 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0	0	0
15	п/ш 1,0 мл вбитої формаліном цільноклітинної дифтерійної вакцини	2,0	1,0	0,5	0,5
16	п/ш 1,0 мл вбитої формаліном цільноклітинної дифтерійної вакцини	2,0	1,0	0,5	1,0
17	п/ш 1,0 мл вбитої формаліном цільноклітинної дифтерійної вакцини	0,5	0,125	0,06	0,03
К	п/ш 1,0 мл АД (20 Lf)	0	0	0	0

Звертає на себе увагу, що вбита формаліном цільноклітинна дифтерійна вакцина, як найбільш повноцінний в антигенному відношенні препарат, вже через тиждень після щеплення стимулювала антитоксичний імунітет до рівня 0,5-2,0 МО/мл (кролі №№ 15-17), який впродовж місяця поступово знижувався до рівня 0,03-1,0 МО/мл.

Швидке збільшення рівню антитіл виявила комбінація вдвічі розведеного супернатанту серії 1 із дифтерійним анатоксином (№ 10) –показник 0,5 МО/мл, зареєстрований через 7 днів після імунізації, ще через тиждень досяг 4,0 МО/мл, а надалі утримувався на рівні 2,0 МО/мл.

З другого тижня істотне стимулювання антигенної дії на формування антитоксичного дифтерійного

імунітету виявилось у випадку імунізації мікробним дезінтегратором серії 2: в поєднанні з дифтерійним анатоксином як розведений (1:1000), так і нерозведений препарат показали значні титри антитоксичних антитіл (кролі №№ 1, 9, відповідно). При цьому контрольна тварина (К), яка одержала п/ш 1,0 мл АД (20 Lf), залишилася серонегативною. Слід зауважити, що у випадку кроля № 9, який дав надвисокі титри антитоксинів (понад 256,0 МО/мл) вже з 1-го тижня після вакцинації, тварина мала прищеплювальний анамнез проти дифтерії в минулому році (1000 Lf per os, дробово), тобто в цьому році одержала бустер-імунізацію, хоча й мала нульові титри РПГА напередодні щеплення. До того ж препарат ДЗ II 7 h ввели у склад вакцини у нерозведеному стані. Тому такий значний підйом рівня антитіл свідчить, по-перше, про ефективність створення ґрунт-імунітету пероральним шляхом, і по-друге, що

доза вакцини, яку було взято для ревакцинації, вочевидь була зависокою. В кроля № 1, якого було щеплено аналогічними препаратами, проте вперше, і ад'ювант був розведений в 1000 разів, максимальний рівень анти-токсинів досягнув 16,0 МО/мл і був зареєстрований пізніше – на 3-4-му тижні після вакцинації.

Привертає увагу той факт, що введення нерозведеного мікробного дезінтеграту самого по собі без дифтерійного анатоксину теж стимулювало утворення антитоксинів – на другому-третьому тижні титр анти-тіл зростав від 0,06 до 16,0 МО/мл (№ 11).

Додавання гелю гідроксиду алюмінію до будь-якого з антигенних препаратів, у тому числі й до розведеного 1:1000 мікробного дезінтеграту серії 2, показало майже нульові титри РПГА впродовж всього строку спостереження після підшкірної вакцинації кролів (№№ 5-8).

З другого тижня реєструвався захисний титр антитіл після щеплення разом із дифтерійним анатоксином препарату клітинних стінок серії 2 (№ 4) – від 0,5 - 1,0 до 0,25 МО/мл.

Інші варіанти досліджуваних комбінованих антигенних препаратів або давали нульові показники

(№№ 3, 14), або їх застосування призводило до епізодичної (1-2-разово) появи мінімального титру антитоксичних антитіл 0,03 МО/мл (№№ 2, 12, 13).

Отже дані табл. 3 свідчать про те, що бактеріальні антигени дифтерії здатні стимулювати гуморальний антитоксичний імунітет при їх введенні як з очищеним концентрованим (несорбованим) дифтерійним анатоксином, так і самостійно. Але потрібно оптимізувати дозу для імунізації.

Вивчення впливу досліджуваних антигенних препаратів дифтерії на динаміку гуморального імунітету при їх пероральному введенні здійснювалось (1) при бустер-імунізації кролів з першої серії щеплень, які після парентеральної вакцинації виявилися серонегативними або давали мінімальні титри – йдеться про кролів №№ 2, 3, 4, 5, 6, 17 (табл. 4); (2) при парентеральному щепленні зменшених доз очищеного концентрованого (несорбованого) дифтерійного анатоксину і офіційної АД-м вакцини (табл. 5); (3) при створенні ґрунд-імунітету в інтактних кролів пероральним шляхом (табл. 6).

Таблиця 4 – Динаміка рівня гуморального імунітету проти дифтерії (за даними РПГА) в сироватках крові кролів після повторного введення досліджуваних антигенних препаратів per os

№№ кролів	Склад вакцини при першому (парентеральному) щепленні	Склад вакцини при другому (пероральному) щепленні та схема її введення*	Рівень антитоксинів, МО/мл			
			7 днів	14 днів	21 день	28 днів
2	п/ш 0,4 мл СН (1:2000) + 1,0 мл АД (20Lf)	2,0 мл ДЗ VI 7 h	0	0	0	0
3	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер.1 + 1,0 мл АД (20 Lf)	2,0 мл ДЗ VI 7 h + АД 4,0 мл (600 Lf)	0	0	0	0
4	п/ш 0,4 мл кл. ст., сер. 2 + 1,0 мл АД (20 Lf)	2,0 мл СН VI	4,0	4,0	4,0	4,0
5	п/ш 1,0 мл ДЗ II 7 h (1:1000) + 0,4 мл гелю $Al_2(OH)_3$	2,0 мл СН VI + АД 4,0 мл (600 Lf)	0	0	0	0
6	п/ш 1,0 мл СН (1:2000) + 0,4 мл гелю $Al_2(OH)_3$	2,0 мл СН-ф VI + АД 4,0 мл (600 Lf)	0	0	0	0
17	п/ш 1,0 мл вбитої формаліном цільноклітинної дифтерійної вакцини	2,0 мл СН-ф VI	0	0	0	0

* Примітка: вакцина вводилася за два рази – зранку та в обід натщесерце по 1,0 мл ад'юванта + 2,0 мл АД

Слід зауважити, що в групі кролів, яких було імунізовано за комбінованими схемами п/ш + per os, під час ревакцинації використовувались інші ад'юванти, ніж введені при первинному щепленні (табл. 4). Майже всі тварини з цієї групи (№№ 2, 3, 5, 6, 17) залишилися з нульовими титрами антитіл впродовж 4-х тижнів спостереження. В кроля № 4, ревакцинованого чистим препаратом СН VI, в той же період сформувався досить високий стабільний рівень антитоксинів – 4,0 МО/мл.

Можливо, що негативні результати пояснюються надлишком загальної дози антигенів, одержаних тваринами при парентеральному та пероральному щепленні. Для того, щоб перевірити одержані результати, вплив досліджуваних антигенних препаратів на формування гуморального імунітету вивчали при парентеральній вакцинації кролів зменшеними дозами дифтерійних вакцин (АД і АД-м) у комбінації з тими ж самими бактеріальними ад'ювантами (табл. 5).

Таблиця 5 – Динаміка рівня гуморального імунітету (за даними РПГА) в сироватках крові кролів після їх парентеральної вакцинації проти дифтерії зменшеними дозами очищеного концентрованого (несорбованого) або сорбованого дифтерійного анатоксину в поєднанні з досліджуваними антигенними препаратами

№№ кролів	Склад вакцини	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
19	п/ш 0,33 мл АД (2 Lf) + 1,0 мл ДЗ VI 7 h	2,0	1,0	1,0	0,25
21	п/ш 0,33 мл АД (2 Lf) + 1,0 мл ДЗ VI 7 h (розв. в 2,5 рази)	0,5	2,0	0,5	0,5
22	п/ш АД 0,33 мл (2 Lf) + 1,0 мл СН VI	1,0	0,5	0,25	0,125
23	п/ш АД 0,33 мл (2 Lf) + 1,0 мл СН-ф VI	0,125	0	0	0
K1	п/ш АД 0,33 мл (2 Lf)	0	0	0	0
В середньому для кролів №№ 19, 21-23		0,9	0,9	0,4	0,2
24	п/ш 0,1 мл сорб. АД-м (1 Lf) + 0,5 мл ДЗ VI 7 h (розв. в 2,5 рази)	0	4,0	1,0	0,25
25	п/ш 0,1 мл сорб. АД-м (1 Lf) + 0,5 мл СН VI	0,125	8,0	8,0	4,0
26	п/ш 0,1 мл сорб. АД-м (1 Lf) + 0,1 мл СН-ф VI	4,0	4,0	8,0	4,0
20	п/ш 0,1 мл сорб. АД-м (1 Lf) + 0,1 мл ДЗ VI 7 h	0,125	«—»	0,125	«—»
K2	п/ш 0,1 мл сорб. АД-м (1 Lf)	0	0	0	0
В середньому для кролів №№ 20, 24-26		1,1	5,3	4,3	2,75

*Примітка: «—» – в кроля не вдалося одержати достатню кількість сироватки крові.

Вже через тиждень після вакцинації в 7 з 8 щеплених кролів сформувався захисний рівень (за даними РПГА) титрів антитіл: від 0,125 до 4,0 МО/мл. У 8-ї тварини значний титр антитіл – 4,0 МО/мл – був зареєстрований з другого тижня. Контрольні тварини (K1 і K2), імунізовані АД, залишилися серонегативними.

Отже комбінація очищеного концентрованого (несорбованого) дифтерійного анатоксину і АД-м вакцини з досліджуваними антигенними препаратами субклітинних комплексів збудника дифтерії в зазначених в таблиці співвідношеннях виявилася адекватною щодо виявлення їх ад'ювантної дії на гуморальний імунітет.

Динаміка титрів впродовж місяця показала поступове їх зниження, проте в більшості тварин рівень антитіл залишився захисним, а в №№ 25 і 26, щеплених АД-м в поєднанні з СН VI і СН-ф VI, – високим – 4,0 МО/мл. Лише одна тварина – № 23 – давала негативний результат РПГА впродовж трьох останніх тижнів спостереження.

Взагалі середній титр антитіл за 4 тижні в кролів, імунізованих АД-м вакциною (в дозі 1 Lf) з різними бактеріальними ад'ювантами, в 5,6 рази перевищував рівень антитіл групи тварин, що імунізувалися очищеним концентрованим (несорбованим) дифтерійним анатоксином (в дозі 2 Lf) в комбінації з аналогічними антигенними препаратами.

Вивчення впливу досліджуваних антигенних препаратів на формування гуморального імунітету при

первинному пероральному щепленні кролів з варіюванням дози та кратності введення вакцини показало, що в кожній парі тварин, яку вакцинували тими ж самими препаратами за однаковою схемою, за винятком серонегативних кролів №№ 37 і 38, в однієї спостерігалось утворення дифтерійних антитоксинів, а інша залишалася серонегативною (табл. 6).

Контрольні тварини (K1-K4), які одержували лише дифтерійний анатоксин без ад'ювантів, мали нульові титри антитіл впродовж строку спостереження. Тобто всі досліджувані препарати – ДЗ VI 7 h, СН VI, СН-ф VI – в тій чи іншій мірі виявили ад'ювантну дію щодо дифтерійного анатоксину.

Найбільший рівень антитоксинів – 8,0 МО/мл – сформувався в кроля № 30, імунізованого з додаванням препарату СН VI, при введенні вакцини впродовж 1-го дня з другого тижня після щеплення. Дробове введення дифтерійного анатоксину впродовж 4-х днів у двічі меншій загальній дозі виявилось найефективнішим при поєднанні анатоксину з препаратом СН VI – рівень антитіл 4,0 МО/мл (кріль № 36).

Слід зауважити, що при введенні великої дози анатоксину (1200 Lf) за один день в двох тварин сероконверсія відбулася вже з 1-го тижня (№№ 27, 30), а при дробовому введенні вакцини в дозі 600 Lf (№№ 33-38) титри антитіл з'являлися з другого тижня (№№ 34, 36).

Таблиця 6 – Динаміка рівня гуморального імунітету (за даними РПГА) в сироватках крові кролів після їх пероральної вакцинації проти дифтерії досліджуваними антигенними препаратами

№№ кролів	Склад вакцини	Рівень антитоксинів, МО/мл			
		7 днів	14 днів	21 день	28 днів
27	по 1,0 мл ДЗ VI 7 h + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	1,0	0,125	0,125	0
28	по 1,0 мл ДЗ VI 7 h + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	0	0	0
29	по 1,0 мл СН VI + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	0	0	0
30	по 1,0 мл СН VI + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0,125	8,0	8,0	8,0
31	1,0 мл СН-ф VI + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	0	0	0
32	по 1,0 мл СН-ф VI + АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	1,0	1,0	0,5
K1	АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	0	0	0
K2	АД 2,0 мл (600 Lf) – двічі на день	0	0	0	0
33	по 1,0 мл ДЗ VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0
34	по 1,0 мл ДЗ VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	2,0	1,0	1,0
35	по 1,0 мл СН VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0
36	по 1,0 мл СН VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	2,0	4,0	4,0
37	по 1,0 мл СН-ф VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0
38	по 1,0 мл СН-ф VI 7 h + АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0
K3	АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0
K4	АД 0,5 мл (150 Lf) – впродовж 4-х днів	0	0	0	0

проти дифтерії під час використання різних схем щеплення (парентеральних, пероральних, комбінованих) і різних доз дифтерійного анатоксину (1-2 Lf або 20 Lf п/ш, 600 і 1200 Lf per os) виявилось, що всі препарати субклітинних комплексів дифтерії, які відрізнялись один від одного ступенем дезінтеграції мікробних клі-

Висновки

- 1) При вивченні впливу досліджуваних антигенних препаратів на формування гуморального імунітету

- тин, здатні стимулювати гуморальний антитоксичний імунітет при їх введенні з очищеним концентрованим (несорбованим на гідроксиді алюмінію) дифтерійним анатоксином, а деякі з них і самостійно (ДЗ II 7 h, вбита формаліном цільноклітинна дифтерійна вакцина).
- 2) При пероральному щепленні кролів дифтерійним анатоксином в комбінації з досліджуваними препаратами антигенна дія проявилася швидше (з 1-го тижня після вакцинації) у випадках введення збільшеної дози вакцини в один день у порівнянні з її дробовим введенням. Найвищий рівень антитіл – до 4,0-8,0 МО/мл – сформувався в тварин, імунізованих з додаванням препарату СН VI.
 - 3) Кролі, в яких напередодні проведення імунізації були нульові титри антитоксинів в РПГА, але їх було вакциновано проти дифтерії в минулому році з використанням перорального введення вакцини (1000 Lf per os, дробно) або комбінованої схеми щеплення (500 Lf АД перорально дробно + 0,5 мл (5 Lf) АД п/ш через місяць) відрізнялися від інших тварин, яких в цьому році імунізували вперше, швидкою появою в крові високого рівню протидифтерійних антитоксичних антитіл у випадках використання як комбінованої, так і парентеральної схеми щеплення.
 - 4) Субтоксичні дози нативного дифтерійного токсину (в розведеннях від 1:100 до 1:10 000) не впливали на утворення протидифтерійних антитоксичних антитіл при імунізації кролів очищеним концентрованим (несорбованим на гідроксиді алюмінію) дифтерійним анатоксином.
 - 5) Сорбція досліджуваних препаратів субклітинних комплексів на гідроксиді алюмінію при парентеральному застосуванні не сприяла прояву їх антигенної дії.

Список літератури

1. Епидемиологическая ситуация по дифтерии на Украине / Л.М.Чудная, В.Г.Оксинок, Л.С.Красюк, Л.В.Мороз, С.И.Брыжата, И.М.Скуратовская, Е.В.Демидовская // Журн. эпидемиол., 1999. – № 1. – С. 10-12.
2. Molecular epidemiology of *C. diphtheriae* strains during different phases of the diphtheria epidemic in Belarus / Valentina Kolodkina, Leonid Titov, Tatyana Sharapa, Francine Grimont, Patrick AD Grimont, Androulla Efstratiou // BMC Infect Dis., 2006. – v. 6. – P. 129-137.
3. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии // Журн. микробиол., 1999. – № 2. – С. 92-96.
4. Mattos-Guaraldi AL, Moreira LO, Damasco PV, Hirata Júnior R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world – an overview // Mem Inst Oswaldo Cruz., 2003. – v. 98. – P. 987-989.
5. Е.А.Шмелева, М.О.Биргер. Получение препаратов клеточных стенок *C.diphtheriae* и определение их антигенного состава // Журн. микробиол., 1971. – № 4. – С. 73-78.
6. Сравнительная характеристика некоторых антигенных фракций дифтерийного микроба / Е.А.Шмелева, И.К.Мазурова, В.А.Бочкова, Л.М.Филиппова // ЖМЭИ, 1974. – № 4. – С. 31-35.
7. Характеристика дифтерийной бактериальной вакцины и результаты ее исследования в эксперименте и на людях / Е.А.Шмелева, Д.П.Никитин, А.Н.Кузиков, Л.М.Яровая, В.П.Бочкова, С.С.Маркина, Н.Н.Кондрашина // Тез. докл. V Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. – М., 1985. – С. 69-71.
8. Кондрашина Н.Н., Шмелева Е.А., Берестень С.Ф. Выделение и иммунохимическая характеристика растворимых мембранных белков клеточных стенок коринебактерий дифтерии // Биохимия, 1987. – Т. 52. вып. 6. – С. 978-983.
9. Шмелёва Е.А., Кузиков А.Н., Сухорукова Н.Л. Титры антител к антигенам клеточных стенок коринебактерий дифтерии у различных групп детей // Эпидемиология, микробиология и профилактика капельных инфекций: Сб.науч. тр. МНИИЭМ. – М., 1983. – С. 50-56.
10. Е.А.Шмелева, Н.Н.Кондрашина, И.Г.Батурина. Иммуномодулирующие свойства антигенов клеточных стенок нетоксигенных коринебактерий дифтерии // Антибиотики и химиотерапия, 1988. – т. XXXIII. – № 8. – С. 601-605.
11. И.К.Мазурова. Роль противомикробных антител в пассивной защите организма от дифтерийной инфекции // Сб. науч. тр. МНИИЭМ «Острые детские инфекции», 1978. – Т. 19. – С. 26-34.
12. М.О.Биргер, Е.П.Гренкова. Определение напряженности антимикробного противодифтерийного иммунитета в остром опыте // Сб. науч. тр. МНИИЭМ «Острые детские инфекции», 1978. – Т. 19. – С. 34-39.
13. Биргер М. О., Гренкова Е. П., Фиш Н. Г., Заводнова Т. И., Кузиков А. Н. Защитный соматический антиген *Corynebacterium diphtheriae* // Журн. микробиол. – 1980. – № 1. – С. 46-48.
14. В.Ф.Учайкин, О.В.Шамшева. Вакцинопрофилактика. Настоящее и будущее. М.: Гэотар-мед, 2001. – 400с.
15. Біологічна характеристика антигенів збудника дифтерії, виділених за допомогою фізико-хімічних методів / І.В.Єлисєєва, С.М.Бабич, Л.А.Ждамарова, В.І.Білозерський, Т.В.Горбач, С.А.Колпак, І.В.Бобирєва // Аналіз Мечніковського інституту.-2008.- №№ 3.- С.25-31.- Режим доступу до статті: <http://www.imiamn.hutl.ru/journ>

УДК 579.871.1:615.371:616-097

АНТИГЕННІ ТА АД'ЮВАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ПРЕПАРАТІВ СУБКЛІТИННИХ КОМПЛЕКСІВ ЗБУДНИКА ДИФТЕРІЇ ПРИ ЩЕПЛЕННІ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Єлисєєва І.В., Бабич С.М., Ждамарова Л.А., Білозерський В.І., Скляр Н.І., Колпак С.А., Бобирєва І.В.

Проведені дослідження присвячені розробці підходів до удосконалення вакцинних препаратів проти дифтерії шляхом одержання антигенних мікробних фракцій збудника, які б підвищували протибактеріальний імунітет як фактор локалізації дифтерійної інфекції в організмі та стимулювали б розвиток антитоксичного імунітету. Експериментальні зразки нативних антигенів збудника дифтерії досліджувались за їх антигенними та ад'ювантними властивостями. Одержані антигенні фракції субклітинних комплексів дифтерії здатні стимулювати гуморальний антитоксичний імунітет при їх введенні з

очищенням концентрованим дифтерійним анатоксином, а деякі з них і самостійно, при застосуванні як парентеральної, так і пероральної схем щеплення.

Ключові слова: антигенні та ад'ювантні властивості, препарати, дифтерія, щеплення

independently using parenteral and oral immunization schemes.

Key words: antigenic and adjuvant properties, preparations, diphtheria, immunization

УДК 579.871.1:615.371:616-097

**АНТИГЕННЫЕ И АДЬЮВАНТНЫЕ СВОЙСТВА
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ПРЕПАРАТОВ
СУБКЛЕТОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ДИФТЕРИИ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Елисеева И.В., Бабич Е.М., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Скляр Н.И., Колпак С.А., Бобырева И.В.

Проведенные исследования посвящены разработке подходов к усовершенствованию вакцинных препаратов против дифтерии путем получения антигенных микробных фракций возбудителя, которые бы повышали антибактериальный иммунитет как фактор локализации дифтерийной инфекции в организме и стимулировали бы развитие анитоксического иммунитета. Изучались антигенные и адьювантные свойства экспериментальных образцов антигенных препаратов возбудителя дифтерии. Полученные антигенные фракции субклеточных комплексов дифтерии способны стимулировать анитоксический гуморальный иммунитет при введении вместе с очищенным концентрированным дифтерийным анатоксином, а некоторые из них и самостоятельно, при использовании как парентеральной, так и пероральной схем иммунизации.

Ключевые слова: антигенные и адьювантные свойства, препараты, дифтерія, імунізація

UDC 579.871.1:615.371:616-097

ANTIGENIC AND ADJUVANT PROPERTIES OF EXPERIMENTAL SAMPLES OF PREPARATIONS OF SUBCELLULAR COMPLEXES OF THE ACTIVATOR OF THE DIPHTHERIA AT IMMUNIZATION OF LABORATORY ANIMALS

Yelyseyeva I.V., Babych Ye.M., Zhdamarova L.A., Belozersky V.I., Sklyar N.I., Kolpak S.A., Bobireva I.V.

The carried out researches are devoted working out of approaches to improvement of vaccinal preparations against a diphtheria by reception of antigene microbic fractions of the activator which would raise antibacterial immunity as the factor of localisation of a diphtheritic infection in an organism and would stimulate development of antitoxic immunity. Were studied antigene and adjuvant properties of experimental samples of antigenic preparations of the activator of a diphtheria. The received antigene fractions of subcellular complexes of a diphtheria are capable to stimulate antitoxic humoral immunity at introduction together with cleared concentrated diphtheritic toxoid and