

УДК 57.083.3

АД'ЮВАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ГІАЛУРОНАТУ НАТРІЮ В ДОСЛІДАХ ІМУНІЗАЦІЇ ТВАРИН БАКТЕРІЯМИ РОДУ SALMONELLA

В.П. Фекета, А.О. Сікура, С.В. Орос, В.М. Студеняк, К.Б. Ківежді, О.М. Маргітич, А.І. Туряниця

Ад'ювантні властивості гіалуронату натрію в дослідях імунізації тварин бактеріями роду Salmonella. - В.П. Фекета, А.О. Сікура, С.В. Орос, В.М. Студеняк, К.Б. Ківежді, О.М. Маргітич, А.І. Туряниця. – Імунізація кроликів підігрітим антигеном бактерій S. typhimurium, S. pullorum, S. gallinarum разом з гіалуронатом натрію приводила до отримання антисальмонельозних сироваток, титри яких перевищували титри сироваток, отриманих з використанням ад'юванта Дрейнда в реакції розгорнутої гемаглютинації в два рази, в реакції непрямой гемаглютинації – в чотири рази, були рівні або в два рази вищі в реакції зв'язування комплекменту, що дозволяє рекомендувати гіалуронат натрію в якості ад'юванту для отримання імунних антибактеріальних сироваток.

Ключові слова: Salmonella, ад'ювант, гіалуронат натрію

Адреса: Ужгородський національний університет, вул. Волошина, 32, Ужгород, 88000, Україна

Adjuvant properties of sodium hyalurate in experiments on immunization of animals by bacteria genus Salmonella. – Feketa V., Szikura A., Oros S., Studenjak V., Keveshdi K., Margitich O., Turianitsa A. – Immunization of rabbits by heated antigen of the bacteria S. typhimurium, S. pullorum, S. gallinarum by injection with sodium hyalurate resulted in the development of antiserum with antibody content exceeded the titres of the serum obtained with use of Freynd adjuvant. This was proved by the reaction of unfolded gemagglutination (two-times titre increase), indirect gemagglutination - four times increase. The levels of antibodies were equal or in two times higher in the reaction of the complement cascade. This allows to recommend sodium hyalurate as adjuvant for quick development of antiserum against Salmonellas.

Key words: Salmonella, adjuvant, sodium hyalurate.

Address: Uzhgorod national university, Voloshyn str., 32, Uzhgorod, 88000, Ukraine

Бактерії роду Salmonella відомі як збудники тяжких інфекційних захворювань у клінічній та ветеринарній практиці. [1-4]. Обов'язковим етапом мікробіологічної діагностики цих хвороб є серологічна ідентифікація збудників. Оскільки чутливість і специфічність серологічних реакцій зумовлена якістю діагностичних сироваток, у технології їх отримання часто використовуються ад'юванти, які посилюють вироблення специфічних антитіл при імунізації тварин.

У зв'язку з цим було цікаво перевірити ад'ювантні властивості гіалуронату натрію, порівнявши їх з дією відомого доповнювача - повного ад'юванту Дрейнда. Дослідження проводили в умовах імунізації тварин бактеріями роду Salmonella.

Матеріали і методи

При отриманні імунних сироваток до бактерій Salmonella typhimurium, Salmonella pullorum і Salmonella gallinarum в якості антигенів використовували нагріті на протязі години при 60⁰ С су-

спензії культур цих мікроорганізмів. Завис нагрітих антигенів сальмонел з оптичною густиною 2 млрд. мікробних тіл в 1 мл вводили внутрішньовенно кроликам за схемою – 1,0 мл ; 1,5 мл ; 2 мл; 2.0 мл з інтервалом 5-7 днів. При імунізації тварин з використанням ад'ювантів їх суспензію з антигеном вводили одноразово внутрішньом'язево. У першій серії дослідів імунізацію проводили тільки сальмонельозними антигенами. В другій групі тварин у якості доповнювача використовували повний ад'ювант Дрейнда, до складу якого входили вакцинальний штам Mucobacterium tuberculosis, вазелін і ланолін. Готували його ex tempore. В третій серії дослідів у якості ад'юванту використовувався гіалуронат натрію, який був екстрагований нами з тканин тварин.

Ефективність імунізації перевіряли, враховуючи в антисальмонельозних сироватках титри аглютининів у розгорнутій реакції аглютинації, що була проведена об'ємним методом (РА), титри гемосенситинів – у реакції непрямой гемаглютинації (РНГА), а також титри комплекментзв'язуючих антитіл – у реакції зв'язування комплекменту (РЗК).

У РНГА в якості діагностикуму використовували оброблені формаліном еритроцити I (0) групи крові людини, сенсibilізовані відповідним нагрітим сальмонельозним антигеном. Серологічні реакції ставили згідно загальноприйнятими методами [5].

Результати досліджень та їх обговорення

Порівняльне вивчення здатності гіалуронату натрію та повного ад'юванту Дрейнда посилювати синтез антитіл при імунізації кроликів бактеріями роду *Salmonella* ми проводили, визначаючи перш за все титри аглютинуючих антитіл до бактерій роду *Salmonella*. Результати дослідів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Дія ад'ювантів на рівень аглютининів у сироватці крові кроликів, імунізованих бактеріями роду *Salmonella*.

Імунні сироватки до виду сальмонел	Титри реакції аглютинації при використанні ад'ювантів		
	без ад'юванту	ад'ювант Дрейнда	гіалуронат натрію
<i>S. typhimurium</i>	1:200	1:400	1:1600
<i>S. pullorum</i>	1:400	1:800	1:3200
<i>S. gallinarum</i>	1:200	1:400	1:1600

Дані, наведені в таблиці 1, свідчать про те, що в сироватці піддослідних кроликів, для імунізації яких використовували тільки нагрітий антиген *S. typhimurium* без ад'ювантів, титр аглютинуючих антиген не перевищував 1:200. Додавання до сальмонельозного антигену ад'юванту Дрейнда призводило до формування дещо більш високого рівня антитіл. Реакція аглютинації при цьому була позитивною при розведенні сироватки 1:400. Використання гіалуронату натрію в якості ад'юванту підвищувало рівень антитіл до *S. typhimurium* до 1:1600, що на два розведення перевищувало показник титру антитіл в сироватці тварин, імунізацію яких проводили з використанням ад'юванту Дрейнда.

Сироватки до *S. pullorum*, отримані без використання ад'ювантів, були активними в граничному розведенні 1:400. Використання у другій серії дослідів ад'юванту Дрейнда призводило до збільшення титру сироватки до 1:800. У випадку використання гіалуронату натрію для імунізації кроликів відзначали значне збільшення чутливості діагностичних сироваток – до розведення 1:3200, що у два рази перевищувало показники, отримані при використанні доповнювача Дрейнда.

Імунізація кроликів нагрітою культурою *S. gallinarum* *per se* призводила до отримання сироваток з титром 1:200. Додавання до нагрітого антигену сальмонели галінарум ад'юванту Дрейнда збільшувало інтенсивність синтезу антитіл в ор-

ганізмі піддослідних тварин, при цьому максимальне розведення сироватки, реагуюче в реакції аглютинації, сягало 1:400. В третій серії дослідів де в якості ад'юванту ми використовували гіалуронат натрію, титри діагностичних сироваток збільшувались до 1:1600.

Таким чином, у кролів першої групи, імунізацію яких проводили без ад'ювантів, титр РА визначався видом сальмонел. Для *S. typhimurium* та *S. gallinarum* він складав 1:200, для *S. pullorum* – 1:400. Застосування ад'юванту Дрейнда в процесі імунізації призводило до збільшення чутливості антисироваток. Їх титри, у порівнянні з такими у кролів першої групи, збільшувались у два рази і складали для *S. typhimurium* та *S. gallinarum* 1:400, для *S. pullorum* – 1:800, у сироваток, отриманих з використанням гіалуронату натрію-в чотири рази, відповідно з титрами 1:1600, 1:1800 та 1:3200.

Порівнюючи результати використання доповнювача Дрейнда і гіалуронату натрію в якості ад'ювантів при імунізації досліджуваними бактеріями роду *Salmonella*, можна відмітити, що у всіх випадках ефективність використання гіалуронату натрію була більшою.

У таблиці 2 наведена гемосенситивна активність сироваток, що були отримані при імунізації тварин досліджуваними бактеріями роду *Salmonella* з використанням ад'юванту Дрейнда, гіалуронату натрію і без додатків.

Таблиця 2. Вплив ад'ювантів на титри реакції непрямої гемаглютинації імунних антисальмонельозних сироваток з еритроцитарним діагностикумом, сенсibilізованим нагрітими антигенами сальмонел.

Імунні сироватки до виду сальмонел	Титри реакції непрямої гемаглютинації при використанні ад'ювантів		
	без ад'юванту	ад'ювант Дрейнда	гіалуронат натрію
<i>S. typhimurium</i>	1 : 320	1 : 1280	1 : 10240
<i>S. pullorum</i>	1 : 640	1 : 5120	1 : 20480
<i>S. gallinarum</i>	1 : 320	1 : 1280	1 : 10240

Як видно з наведених у таблиці 2 даних, в першій серії дослідів, де імунізацію проводили тільки антигеном *S. typhimurium*, титри РНГА з ерот-рочитарним діагностикомом, сенсibilізованим гомологічними бактеріями, дорівнювали 1:320. Використання для отримання антисироваток суміші бактеріального антигену та ад'юванту Дрейнда збільшувало активність сироватки, її титри збільшувались до 1:1280. Різке збільшення титрів діагностичної сироватки (до 1:10240) відмічали у тій групі кролів, де в якості ад'юванту антигену *S. typhimurium* ми використовували гіалуронат натрію. Тут, у порівнянні з імунними сироватками тварин другої групи, титр збільшувався у чотири рази.

Імунізація тварин виключно нагрітим антигеном *S. pullorum* сприяла отриманню сироваток з титром 1:640. Введення ад'юванту Дрейнда з антигеном *S. pullorum* у другій серії дослідів збільшувало інтенсивність утворення антитіл, РНГА при цьому була позитивною при розведенні сироватки 1:5120. В третій групі кролів, де в процесі імунізації бактеріальний антиген доповнювали гіалуронатом натрію, титр отриманих сироваток був найбільш високим і сягав показника 1:20480, що у чотири рази більше, ніж при використанні ад'юванту Дрейнда.

Аналогічну картину порівняльного аналізу ад'ювантної дії доповнювача Дрейнда та гіалуро-

нату натрію відмічали при отриманні імунних сироваток до *S. gallinarum*. Застосування ад'юванту Дрейнда для імунізації збільшувало титр гемосенсибілізуючих антитіл від 1:320, у кролів першої групи, до 1:1280, тобто у чотири рази. Використання гіалуронату натрію сприяло отриманню сироваток з більш високою активністю – до розведення 1:10240, що перевищувало вихідний титр у вісім разів, а титр сироватки кролів другої групи – у чотири рази.

Підсумовуючи отримані результати дослідження ад'ювантної дії доповнювача Дрейнда та гіалуронату натрію в РНГА, можна зробити висновок, що при імунізації кролів взятими в дослід бактеріями *S. typhimurium*, *S. Pullorum* і *S. gallinarum* інтенсивність синтезу гемосенситинів була у чотири рази більшою у випадку використання гіалуронату натрію, ніж доповнювача Дрейнда.

Ад'ювантні властивості гіалуронату натрію ми також перевіряли, порівнюючи рівень формування комплементзв'язуючих антитіл в умовах його використання (третья група кролів) з тими які відмічали при використанні ад'юванту Дрейнда (друга група тварин) та в контрольних дослідах, де імунізацію проводили без доповнювачів (перша група кролів). Результати РЗК із сироватками крові наведених груп кролів показаних в таблиці 3.

Таблиця 3. реакції зв'язування комплементу у кролів, імунізованих без доповнювачів, з ад'ювантом Дрейнда та з гіалуронатом натрію.

Імунні сироватки до виду сальмонел	Імунізація тварин		
	без ад'юванту	ад'ювант Дрейнда	гіалуронат натрію
<i>S. typhimurium</i>	1 : 4	1 : 16	1 : 16
<i>S. pullorum</i>	1 : 4	1 : 16	1 : 32
<i>S. gallinarum</i>	1 : 2	1 : 8	1 : 16

Як видно з наведених у таблиці 3 даних, рівень комплементзв'язуючих антитіл у групі кролів, для імунізації яких використовували тільки нагрітий антиген *S. typhimurium*, визначався титром 1:4. Використання ад'юванту Дрейнда призводило до збільшення титру РЗК – 1:16. Такими ж (1:16) були показники РЗК у сироватках тварин, де ад'ювантом був гіалуронат натрію.

Імунізація тварин підігрітою культурою *S. pullorum* викликала формування антитіл, здатних пов'язувати комплемент в титрі 1:4. Ад'ювантні властивості доповнювача Дрейнда відобразились у збільшенні титру реакції до 1:16. У порівнянні з ним гіалуронат натрію виявився більш ефективним ад'ювантом. Титри сироваток, отриманих з його використанням в процесі імунізації кролів були дещо вищими – 1:32.

У випадку використання для імунізації тварин підігрітої культури *S. gallinarum* титр РЗК дорівнював 1:4. Приєднання в антигенну систему до-

повнювача Дрейнда призводило до збільшення титру реакції до 1:8. Гіалуронат натрію в умовах отримання імунних сироваток до *S. gallinarum* проявляв властивості активного ад'юванту – титри комплементзв'язуючих антитіл збільшувались до значення 1:16.

Підсумовуючи отримані результати, можна зробити висновок, що гіалуронат натрію має ад'ювантні властивості. Про це свідчить збільшення титрів імунних сироваток до бактерій роду *Salmonella* – *S. typhimurium*, *S. pullorum* і *S. gallinarum*, отриманих із його використанням. В наших дослідах застосування гіалуронату натрію збільшувало синтез аглютинуючих, гемосенситивних та комплементзв'язуючих антитіл. При цьому слід відмітити, що у всіх випадках активність гіалуронату натрію була вищою і тільки іноді дорівнювала активності стандартного ад'юванту Дрейнда. У порівнянні з останнім, приготування якого необхідно проводити безпосередньо перед

дослідом, гіалуронат зберігається у ліофілізованому вигляді, що також робить більш простим і зручним його використання в якості ад'юванту при отриманні імунних сироваток.

Висновки

1. Використання гіалуронату натрію в якості ад'юванту при імунізації кролів бактеріями *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum* призводило до отримання антисироваток, титр яких в розгорнутій реакції аглютинації перевищував титр сироваток, отриманих з використанням ад'юванту Дрейнда у два рази.

2. Під дією гіалуронату натрію активність синтезу гемосенситивних антитіл, що визначались в реакції непрямой гемаглютинації, у чотири рази перевищувала таку при використанні ад'юванту Дрейнда.

3. Титр комплементзв'язуючих антитіл в імунних антисальмонельозних сироватках, отриманих при використанні в якості ад'юванту гіалуронату натрію, дорівнював або у два рази перевищував його, ніж при використанні доповнювача Дрейнда.

4. Гіалуронат натрію можна рекомендувати в якості ад'юванту при отриманні імунних антибактеріальних сироваток.

-
1. Вакарш Н.А., Бурденко Т.А., Шляхов Э.Н. Чувствительность антибиотикоустойчивых штаммов сальмонелл к новым антибиотикам и химиопрепаратам // Антибиотики и химиотерапия. - 1991. - 36.- № 2. - С. 38-42.
 2. Донин М.В., Бойченко М.Н., Воробьев А.Н. Оценка персистенции рекомбинантного штамма *Salmonella enteritidis* экспрессирующего НВ₂-антиген, в организме мышей и культуре макрофагов // Журн. эпидемиол. и иммунобиол. - 2006. - № 3. - С. 45-49.
 3. Раков А.В., Шубин В.Н., Кузнецова Н.А., Иванис В.А., Шкляр Г.М. Сравнительный анализ штаммов *Salmonella enteritidis*, выделенных от больных системной сальмонеллезной инфекцией // Журн. эпидемиол. и иммунобиол. - 2006. - № 3. - С. 36-39.
 4. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Г.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Способность к формированию биоплёнок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* // Журн. эпидемиол. и иммунобиол. - 2006. - № 4. - С. 38-42.
 5. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // Под ред. М.О. Биргера.- Москва.- 1982. - С. 170-182.

Отримано: 10 травня 2008 р.

Прийнято до друку: 28 травня 2008 р.