

## INAKTYVUOTOS VAKCINOS NUO KIAULIŲ RAUDONLIGĖS IMUNINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS IMUNIZUOJANT PARŠELIUS

Rita Šiugždinienė, Justinas Antanas Dobilas

*Lietuvos veterinarijos akademijos Veterinarijos institutas, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys; tel. (8~346) 60 693; faks. (8~346) 60 697; el. paštas: siugzdiniene@yahoo.de*

**Santrauka.** Adjuvantų parinkimas vakcinoms gaminti labai aktualus atliekant kiaulių raudonligės infekcijos specifinę profilaktiką. Atlikome tyrimus su aliejiniiais adjuvantais, kurie yra mažiau reaktogeniški, kenksmingi, nei kiti vakcinų gamybai naudojami adjuvantai (Freundo adjuvantas, saponinai), ir palyginome jų imuninio atsako stimuliacijos poveikį su aliuminio hidroksido adjuvantu komercinėms vakcinoms gaminti. Kliniškai vakciną įvertinome vakcinuodami paršelius. Paruošėme kontrolinį vakcinos bandinį su „Emulsigen 75“ ir „Emulsigen“ (MVP Laboratories Inc., USA) adjuvantais. Po vakcinacijos visų grupių paršeliai buvo užkrėsti 100 LD<sub>50</sub> dozėmis virulentiška Rb suspensija. Tyrimų metu bandomiesiems gyvuliams iš ausies venos imtas kraujas ir klasikine agliutinacijos reakcija nustatomi antikūnų titrai. Veislinės paršavedės nuolat vakcinuojamos nuo raudonligės. Tik gimę paršeliai įgyja kolostralinių imunitetą, todėl prieš bandymą antikūnų titrus nustatėme visose tiriamosiose grupėse. Aukščiausi antikūnų titrai paršelių kraujo serume buvo praėjus 28 paroms po antros vakcinacijos. Antikūnų titrai paršelių kraujo serume mažėjo iki 7 paros po užkrėtimo. Mūsų tyrimų duomenimis, monovalentinei vakcinai nuo kiaulių raudonligės gaminti optimaliausias adjuvantas – 2 proc. koncentracijos „Emulsigen“. Antikūnų titrų tyrimai parodė, kad LVA VI sukurtos ir paruoštos inaktyvuotos vakcinos su adjuvantu „Emulsigen“ poveikis imunizuojant paršelius atitinka komercinės vakcinos imunologinius rodiklius.

**Raktažodžiai:** kiaulės, raudonligė, adjuvantas, inaktyvuota vakcina, antikūnų titrai.

## DEVELOPMENT AND TESTING OF INACTIVATED VACCINE AGAINST SWINE ERYSIPELAS

Rita Šiugždinienė, Justinas Antanas Dobilas

*Veterinary Institute of Lithuanian Veterinary Academy, Instituto g. 2, LT-56115 Kaišiadorys; Lithuania; tel. +370-346 6 06 93, e-mail: siugzdiniene@yahoo.de*

**Summary.** Selection of adjuvants is very important for producing vaccines against swine erysipelas. The objective of our study was to prepare the experimental vaccine against swine erysipelas using oil emulsion adjuvants - Emulsigen 75 and Emulsigen (MVP Laboratories Inc., USA), which in comparison with Freund's adjuvant and saponines are less allergic and harmful. For control the commercial vaccine against swine erysipelas produced with aluminum hydroxide as adjuvant was used. Twenty-one 2-3 month old pigs were divided randomly into 7 groups each of 3 pigs and vaccinated twice. Before and after vaccination the blood samples from the ear vein of experimental animals for antibody titres were taken. After vaccination all groups of piglets were infected with virulent erysipelas bacteria suspension (100 LD<sub>50</sub>). The antibody titres reached their peak 28 days after the second vaccination and afterwards titres have shown tendency to decrease. The results from this study indicate that vaccine produced with 2% Emulsigen could be recommended for production of monovalent vaccine against erysipelas in pigs. Further, the results of antibody titres showed that efficacy of vaccine against erysipelas in pigs produced with Emulsigen corresponds to commercial vaccines against swine erysipelas.

**Key words:** pigs, erysipelas, adjuvant, inactivated vaccine, antibody titres.

**Įvadas.** Kiaulių raudonligė – aktuali visame pasaulyje problema. Raudonligės bakterijos savo sienelėje turi apie 10 proc. vaškinių-lipidinių medžiagų, todėl yra gana atsparios nepalankiems aplinkos veiksniams. Jų galima rasti įvairiuose pūvančiuose organiniuose substratuose, mėšle, srutose. Ligą gali pernešti vabzdžiai: musės (*Stomoxys calcitrans*), kambarinės musės (*Musca domestica*), galvijų sparvos (*Tabanus bromicus*) ir erkės (Blobel, Schließer, 1994). Norint išvengti kiaulių raudonligės, taikoma specifinė profilaktika (serumai, vakcinos). Tačiau ne visuomet profilaktika užtikrina ilgalaikį, pastovų ir tvirtą imunitetą. Dažniausiai tai susiję su mažu atskirų preparatų imunogeniškumu. Kad būtų pailgintas antigeno veikimas injekcijos vietoje, į vakcinas

dedama adjuvantų. Šie pagal veikimo mechanizmą yra suskirstyti į dvi klases: antigeną transportuojantys ir imunitetą skatinantys (Singh, O'Hagan, 2003). Parenkant adjuvantą vakcinų gamybai didelę reikšmę turi gyvulių rūšis, patogenų specifiškumas, vakcinoje esantis antigenas, imunizacijos būdas ir kt. (Spickler, Roth, 2003).

Inaktyvuotoms vakcinoms nuo kiaulių raudonligės gaminti kaip adjuvantas dažniausiai naudojamas aliuminio hidroksidas – vienintelis adjuvantas, kurį šiuo metu leidžiama naudoti gaminant vakcinas žmonėms (Rivera, 1998; Rivera, Lelešius, 1999). Nors jis nekenksmingas, jo įtaka antikūnų gamybai trumpa ir nestabili. Po vakcinacijos dažnai išsivysto silpnas

imunitetas, ir gyvuliai šia liga susergera. Be to, kartais pasireiškia šalutinis vakcinos poveikis (aukšta temperatūra, bendras silpnumas), todėl inaktyvuotos vakcinos nuo kiaulių raudonligės imuniniam efektyvumui didinti panaudojome naujos kartos aliejinius adjuvantus. Jie pranašesni už kitus, nes juos naudojant vakcinoje reikia mažiau antigeno, sukeliama antikūnus produkuojančių ląstelių hiperplazija (Rivera, 1996; Horzinek et al., 1997). Naudojant kartu su aliuminio hidroksidu nebuvo pastebėtas ir antagonistinis poveikis.

Veterinarijos praktikoje labai dažnai išskyla nesėkmingos imunizacijos problema, nes ne visada laikomasi moksliskai pagrįstų imunizavimo terminų ir schemų. Be to, pasireiškia nepageidautinas šalutinis vakcinos poveikis, kurį dažniausiai sukelia adjuvantai. Taigi adjuvantų parinkimas vakcinoms gaminti bei imuniteto po vakcinavimo ypatumų tyrimai labai aktualūs

ir atliekant kiaulių raudonligės infekcijos specifinę profilaktiką.

**Medžiagos ir metodai.** Kliniškai vakciną įvertinome vakcinuodami paršelius. Bandymo metu juos svėrėme, matavome kūno temperatūrą. Gyvuliai prieš bandymą buvo ištirti patogeninių bakterijų (salmonelių, ešerichijų) ir helmintų atžvilgiu pagal bendrai priimtas metodikas, pasverti. Paršeliai izoliatoriuje buvo šeriami tais pačiais pašarais kaip ir ūkyje (kombinuotaisiais). Bandomieji gyvuliai suskirstyti į 7 grupes, po 3 kiekvienoje.

Paruošėme kontrolinį vakcinos bandinį su skirtingais adjuvantais. Vakcinai pagaminti panaudojome raudonligės bakterijas iš Konevo vakcininės padermės Nr. 286. Bakterinę masę gausinome pagal mūsų pasirinktą bakterijų kultivavimo skystose terpėse metodiką (Šiugždinienė, Dobilas, 1999). Bandomosios vakcinos dozės ir vakcinacijų schema pateikta 1 lentelėje.

1 lentelė. Bandomosios vakcinos dozės ir paršelių vakcinacijos schemas

Grupės Nr.	Adjuvanto koncentracija, %	Vakcinos dozė		Rb koncentracija
		I vakcinacija	II vakcinacija	
1	„Emulsigen 75“ – 2 %	5,0 ml	5,0 ml	1×10 <sup>9</sup> m.k./ml
2		2,5 ml	2,5 ml	
3		1,5 ml	1,5 ml	
4	„Emulsigen“ – 2 %	5,0 ml	5,0 ml	1×10 <sup>9</sup> m.k./ml
5		2,5 ml	2,5 ml	
6		1,5 ml	1,5 ml	
7	Komercinė vakcina	pagal instrukciją		

Praėjus 28 paroms po antros vakcinacijos, visų grupių paršeliai buvo užkrėsti 100 LD<sub>50</sub> dozėmis virulentiška Rb suspensija. Prieš bandymą, po pirmos ir antros vakcinacijos, praėjus 28 paroms po antros vakcinacijos, 3, 7, 14 ir 28 paroms po užkrėtimo, bandomiesiems gyvuliams iš ausies venos imtas kraujas. Antikūnų titrai nustatyti klasikine aglutinacijos reakcija.

LVA VI sukurtą ir paruoštą vakciną lyginome su komercine inaktyvuota „Erysen“ vakcina (Bioveta, Čekijos Respublika), kurios adjuvantas – aliuminio hidroksidas. Vakcinavome paršelius pagal instrukciją: ~ 2,0 ml kiekvienam paršeliui. Šios grupės paršeliams atlikti analogiški tyrimai kaip ir LVA VI vakcinuotų grupių paršeliams.

Tyrimų rezultatai ir statistiniai duomenys apskaičiuoti kompiuterine programa „Sigma Plot“ ir „Microsoft Excel“ 97“. Skirtumo tarp grupių patikimumo kriterijui (p) nustatyti taikytas Stjudento daugybinio palyginimo metodas. Skirtumas buvo laikomas statistiškai patikimas, kai p<0,05.

**Tyrimų rezultatai.** Kiaulių komplekse veislinės paršavedės nuolat vakcinuojamos nuo raudonligės. Tik gimę paršeliai įgyja kolostralinį imunitetą, todėl prieš bandymą antikūnų titrus nustatėme visose tiriamosiose grupėse (2 lentelė).

2 lentelė. Antikūnų titrų (log<sub>2</sub>) kiekio dinamika paršelių kraujo serume bandymo metu

Antikūnų titrai Tyrimo laikas	2% „Emulsigen 75“			2% „Emulsigen“			Komercinė vakcina
	1 grupė	2 grupė	3 grupė	4 grupė	5 grupė	6 grupė	
	5 ml	2,5 ml	1,5ml	5 ml	2,5 ml	1,5ml	
Prieš vakc.	7,31±0,67	6,64	6,64±0,58	5,64	6,97±0,33	7,64	6,97±0,67
14 d. po I vakc.	13,64	13,31±0,33	13,31±0,33	13,31±0,33	12,64	13,31±0,33	11,97±0,67
14 d. po II vakc.	13,64	13,97±0,33	13,97±0,33	14,64	13,97±0,33	13,64	13,64
28 d. po II vakc..	17,14±1,50	17,64±1,00	18,64	18,64	18,31±0,33	14,31±0,67	18,37±0,27
3 d. po užkr.	13,31±0,33	12,64	12,31±0,33	13,64	12,97±0,33	12,64	12,64
7 d. po užkr.	9,64±0,58	10,64±1,00	9,31±0,33	9,97±0,88	10,64	9,31±0,67	8,97±0,33
14 d. po užkr.	12,31±0,33	11,64±0,58	11,31±0,33	12,64	13,14±0,50	12,31±0,33	11,97±0,33
28 d. po užkr.	13,31±0,33	12,97±0,67	12,64	12,97±0,33	13,14±0,50	13,31±0,33	12,97±0,33

Praėjus 14 parų po pirmos vakcinacijos, antikūnų titrai visų vakcinuotų grupių paršelių kraujo serume žymiai pakilo. Aukščiausi nustatyti 1 grupės paršelių kraujo serume ( $13,64 \log_2$ ). Juos vakcinavome LVA VI paruošta vakcina su adjuvantu „Emulsigen 75“ ( $p < 0,001$ ). Žemiausi antikūnų titrai nustatyti 7 grupės paršelių kraujo serume –  $11,97 \pm 0,67 \log_2$  ( $p < 0,05$ ).

Praėjus 14 parų nuo antros vakcinacijos, antikūnų titrai visų tiriamųjų grupių paršelių kraujo serume pakilo. Aukščiausi nustatyti 4 grupės paršelių kraujo serume ( $14,64 \log_2$ ).

Praėjus 28 paroms po antros vakcinacijos, 3 ir 4 grupių paršelių kraujo serume antikūnų titrai buvo aukščiausi ( $18,64 \log_2$ ,  $p < 0,001$ ).

Praėjus 3 paroms po užkrėtimo, antikūnų titrai visose grupėse sumažėjo, tačiau išliko aukšti ( $p < 0,05$ ).

Praėjus 7 paroms po užkrėtimo, antikūnų titrai dar truputį sumažėjo. Mažiausi buvo 7 grupės titrai –  $8,97 \pm 0,33 \log_2$  ( $p < 0,05$ ).

Praėjus 14 parų po užkrėtimo, antikūnų titrai vakcinuotų paršelių kraujo serume pakilo. Aukščiausi nustatyti 5 grupės ( $13,14 \pm 0,50 \log_2$ ), mažiausi – 3 grupės ( $11,31 \pm 0,33 \log_2$ ) paršelių kraujo serume ( $p > 0,05$ ).

Praėjus 28 paroms nuo užkrėtimo antikūnų titrai kito nežymiai ir išliko aukšti visose tiriamosiose grupėse.

**Rezultatų aptarimas.** Aukščiausi antikūnų titrai paršelių kraujo serume buvo praėjus 28 paroms po antros vakcinacijos. Tuo metu mažiausi antikūnų titrai nustatyti 6 paršelių grupėje (vakcinos dozė 1,5 ml). Imuninis atsakas labai priklauso nuo individualių genetinių ypatybių, antigeno specifiškumo, pasirinkto adjuvanto (Aucouturier et al., 2001; Spickler, Roth, 2003). Veikiant mažoms antigeno dozėms susidaro IgE antikūnai, o panaudojus didelę to paties antigeno dozę, kaupiasi IgM ir IgG klasių antikūnai (Svičiulis ir kt., 1989). T. Sawada ir kitų tyrėjų duomenimis (1987), tik IgG antikūnai sukelia apsauginį poveikį nuo raudonligės, tuo tarpu IgM antikūnai negali apsaugoti nuo susirgimo.

Antikūnų titrai paršelių kraujo serume mažėjo iki 7 paros po užkrėtimo. Sumažėjęs titras rodo organizmo reakciją į antigeną. Vėliau antikūnų titrai pradėjo kilti ir visose grupėse buvo beveik vienodi. Panašius duomenis apie antikūnų titrų dinamiką 1994 metais pateikė H. Blobel ir T. Schließer. Mūsų tyrimų duomenimis, po užkrėtimo aukščiausi antikūnų titrai nustatyti 4 ir 6 tiriamųjų grupių paršelių kraujo serume (adjuvantas – 2% emulsigenas). Manome, kad aliejiniai adjuvantai (šiuo metu – emulsigenas) injekcijos vietoje apsaugo antigeną nuo greitos degradacijos (apgaubia antigenus) ir kartu pratęsia makrofagų ir antigenų kontakto laiką. Tą patvirtina ir kiti mokslininkai (Rivera et al., 1998; Rivera ir Lelešius, 1999; Aucouturier et al., 2001). Inaktyvuotos vakcinos nuo kiaulių raudonligės sudėtyje yra tirpiųjų ir netirpiųjų antigenų, svarbių organizmo imunostimuliacijos procesams. Adjuvantas „Emulsigen“, daugelio autorių nuomone, geriausiai tinka imunostimuliacijai prieš netirpiuosius antigenus.

1 ir 3 tiriamųjų grupių paršelių kraujo serume (adjuvantas – „Emulsigen 75“) nustatyti antikūnų titrai buvo mažesni. „Emulsigen 75“ – tai dviejų aliejinių

adjuvantų – „Emulsigen“ ir „Carbigen“ mišinys. Tas galėjo turėti įtakos silpniam nespecifinio imuninio atsako stimuliavimui. Aukšti antikūnų titrai kraujyje aiškinami ilgu Rb intraląstelių bakterinių antigenų persistavimu organizme.

Iš įvairių antigenų ir naujausios kartos adjuvantų paruošti mišiniai greičiau ir ilgiau stimuliuoja imuninį atsaką, yra ne tokie reaktogeniški. Mūsų tyrimų duomenys tai patvirtina. Panašius tyrimų rezultatus pateikia ir kiti tyrėjai (Ružauskas, 1997; Virgailis, 1998; Lelešius, 1999).

#### Išvados.

1. Monovalentinei vakcinai nuo kiaulių raudonligės gaminti optimaliausias adjuvantas – 2% koncentracijos „Emulsigen“.

2. LVA VI sukurtos vakcinos nuo kiaulių raudonligės imunogeniškumas panašus į komercinės vakcinos imunogeninius rodiklius.

3. LVA VI sukurtos inaktyvuotos vakcinos nuo kiaulių raudonligės su adjuvantais „Emulsigen 75“ ir „Emulsigen“ efektyvumas imunizuojant paršelius atitinka komercinės vakcinos imunologinius rodiklius.

#### Literatūra

- Aucouturier J., Dupuis L., Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001. Vol. 19. P. 2666–2672.
- Blobel H., Schließer T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Stuttgart. 1994. S. 158–159, 167–168, 241–244.
- Horzinek M. C., Schijns V.E.C.J., Denis M., Desmetre P. and Babiuk L.A. Adjuvants and vehicles. In: *Veterinary Vaccinology*. Ed. by P.-P. Pastoret et al. Elsevier Science B. V., 1997. P. 141–144.
- Lelešius R. Naujausios kartos adjuvantų įtaka jūrų kiaulyčių antikūnų nuo kiaulių parvovirusų biosintezės stimuliacijai pirminio ir antrinio imuninio atsako metu. *Biomedicinos mokslo srities agronomijos krypties VI doktorantų konferencijos pranešimai*. LŽI. Akademija. 1999. P. 97–100.
- Lelešius R., Rivera E., Sereika V., Šalomska A. The impact of different adjuvants upon vaccinal induction of secondary immune response against porcine parvovirus. *Veterinarija ir zootechnika*. 1998. N (28). P. 23–28.
- Rivera E. The effect of different adjuvants on the immune system of the pig. *Uppsala*. 1996. P. 67–68.
- Rivera E., Daggfeldt A., Hu S. Ginseng in aluminium-hydroxide adjuvanted vaccines improves the antibody response of pigs to porcine parvovirus and *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Uppsala*. 1998. P. 4.
- Rivera E. ir Lelešius R. Naujos efektyvesnių vakcinų sukūrimo galimybės. *Lietuvos veterinarija*. 1999. P. 30–32.
- Ružauskas M. Pasterelių vakcinos kiaulėms sukūrimas. *Daktaro disertacija*. Kąšiadorys, LVI. 1997.
- Sawada T., Takahashi T., Tamura Y. Protective effect of sera from swine immunized with different fractions from broth culture of an attenuated strain of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1987. Vol. 49. P. 37–42.
- Singh M., O'Hagan D. T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*. 2003 Vol. 33. P. 469–478.
- Spickler A. R., Roth J. A. 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med*. 2003, Vol. 17. P. 273–281.

13. Svičiulis A., Vaičiuvėnas V., Tilindis B. Imunologija. Vilnius „Mokslas“, 1989. P. 45–63.
14. Šiugždinienė R., Dobilas J. Maitinamųjų priedų įtaka kiaulių raudonligės sukėlėjams kultivuoti skystose terpėse. Biomedicinos mokslo srities agronomijos krypties VI doktorantų konferencijos pranešimai. LŽI. Akademija. 1999. P. 121–124.
15. Virgailis M. Salmonelių serotipų paplitimas Lietuvos kiaulių ūkiuose, jų biocheminių ir imunogeninių savybių tyrimai. Daktaro disertacija. Kaišiadorys, LVI. 1998.