

Винахід належить до медицини, біотехнології і ветеринарії, зокрема до мікробіології, і безпосередньо - до способів отримання різноманітних вакцин проти особливо небезпечних інфекцій, а саме для специфічної профілактики туляремії.

Підвищення імуногенності і зниження реактогенності вакцин є головним стратегічним напрямком удосконалення вакцинопрофілактики інфекційних захворювань у всьому світі. Зв'язано це з тим, що існуючі вакцини викликають у частини щеплених осіб небажані реакції і мають недостатньо високу захисну ефективність. Останніми роками особливого значення набуває боротьба з особливо небезпечними інфекціями у зв'язку з можливим використанням їх збудників в якості біологічної зброї. Одним з найбільш вірогідних збудників, який може бути використаний як інструмент біологічної агресії, є збудник туляремії, оскільки він може розповсюджуватися усіма відомими шляхами передачі. При попаданні великих доз *Francisella tularensis* на слизові оболонки навіть у імунізованих існуючими на даний час вакцинами відбувається ураження усіх життєво важливих органів, при цьому на протязі часу, необхідного для встановлення діагнозу, настає загибель захворілих.

Наразі в більшості країн використовується розроблена в Радянському Союзі жива парентеральна туляремія вакцина на основі спеціального селекціонованого штаму *Francisella tularensis* Гайського 15 лінії НДІЕГ або його модифікації. Недоліком зазначеної вакцини і способу її введення, перш за все, є те, що парентеральне введення вакцини супроводжується значною кількістю побічних реакцій, недостатньо високою захисною ефективністю від проникнення в організм великих доз патогенного збудника, а також складністю проведення в короткі терміни масової імунізації в екстремальних умовах [1-3].

Найбільш близьким аналогом (прототипом) запропонованого способу за суттю технічного рішення і очікуваним результатом є заявлений в США Wise і співавторами спосіб одержання вакцин для індукції імунної відповіді [4]. Спосіб передбачає ентеральне введення вакцини, яка складається з нуклеїнової кислоти і поліпептидів *Francisella tularensis*, а також піноутворюючих полімерів, просочених розчинами вказаних антигенів. Вакцина, потрапляючи в підслизові кишечника і функціональні клітини Пейєрових пляшок, має експресуватися або вивільнятися впродовж від одного тижня до декількох місяців, причому основний об'єм зазначеної складнокомпонентної вакцини вводиться після "попередньої" дози. Автори припускають, що внаслідок зазначених маніпуляцій виникає стан безсимптомної інфекції. Після такого щеплення несприйнятливості до зараження патогенним штамом триває близько одного тижня. Для пролонгації стану несприйнятливості щеплених тварин здійснюється додаткова стимуляція спеціальними препаратами.

Таким чином, пропоноване Wise і співавторами технічне рішення по здійсненню імунізації проти туляремії має наступні істотні недоліки:

- технологія одержання вакцини вимагає спеціального устаткування, є складною, трудомісткою і дорогою;
- формування специфічного захисту після складної процедури введення такої вакцини відбувається впродовж декількох місяців;
- стан несприйнятливості щеплених осіб до зараження патогенним штамом є короточасним і триває біля одного тижня;
- пролонгація стану несприйнятливості щеплених осіб досягається тільки після введення спеціальних препаратів;
- спосіб непридатний для використання в оперативних цілях для боротьби з біотероризмом у зв'язку з тривалим строком формування імунітету і його короточасністю.

Окрім перелічених недоліків, слід зазначити, що конструювання вакцин проти туляремії, в першу чергу, має враховувати особливості патогенезу і формування імунітету до цієї інфекції. В основі запропонованої цими авторами технології отримання і введення вакцин покладено завдання з відтворення після імунізації хронічної інфекції у тварин. Разом з тим, відомо, що така інфекція у тварин і людини, зокрема у мишей, які були використані в доказовій частині роботи Wise, викликає короточасний імунітет і сенсibilізацію. Остання є причиною, яка викликає загибель більшої частини експериментальних тварин [5-7]. У деяких випадках подібні вакцини можуть бути об'єктом екологічної небезпеки, оскільки вони направлені на стимуляцію неповноцінного захисту, так як містять окремі фрагменти збудника, а не повний набір антигенних детермінант, внаслідок чого вакцина нездатна запобігти розвитку інфекції при зараженні макроорганізму патогенним збудником. Це особливо актуально для *F. tularensis*. Водночас, з введеною в організм ДНК може виникнути інфекційний агент, який піддається дії спотвореного відбору, що у свою чергу може привести до формування у щеплених нових мутантів і реасортантів збудників, стійких до дії захисних сил організму та існуючих методів лікування й профілактики [8].

Задача запропонованого способу одержання туляреміяної вакцини полягає в створенні системного імунітету шляхом доставки ослаблених (атенуйованих) бактерій *F. tularensis*, що містять весь набір антигенних детермінант збудника, до мукозальних рецепторів шлунково-кишкового тракту, що забезпечить зниження залишкової вірулентності й підвищення рівня та тривалості специфічного захисту.

Поставлене завдання досягається тим, що в якості імунізуючого агента застосовують атенуйований туляреміяний вакцинний штам *F. tularensis* Гайського 15 лінії НДІЕГ, який концентрується на сорбенті. Як сорбент використовують біосумісні кремнійорганічні сполуки. Сорбент перед навантаженням на нього вакцини роздіблюють, суспендуючи препарат у фізіологічному розчині відомими механічними засобами, потім вносять до суспензії сорбенту завись мікробних клітин штаму з розрахунку $10^6 - 10^8$ мікробних клітин на 50 - 100мг сорбенту, після чого матеріал ресуспендують до часток розмірами 10 - 75 мікрон. Одержану сорбовану вакцину вводять перорально.

Процес іммобілізації вакцини, контроль її біологічної активності та введення в організм здійснюють відповідно до розроблених технологічних прийомів запропонованого рішення.

Спосіб одержання мукозальної туляреміяної вакцини здійснюється іммобілізацією мікробних клітин вакцини на носіїв таким чином. Сорбент перед навантаженням на нього вакцини суспендують у фізіологічному розчині відомими механічними засобами до частинок гідрогелю розміром від 10 до 75 мікрон, а потім суспензію сорбенту з'єднують з зависсю мікробних клітин із розрахунку $10^6 - 10^8$ на 50 - 100мг сорбенту

в 1мл суміші, після чого матеріал повторно суспендують впродовж 30 - 40хв. Контроль концентрації мікробних клітин в адсорбованій вакцині здійснюють під мікроскопом. Встановлено, що кількість адсорбованих мікробних клітин має складати приблизно 20кл. на 1 частку сорбенту.

Вказані параметри $10^6 - 10^8$ м.к./мл були визначені емпіричним шляхом. 50 - 100 міліграм сорбенту на 1мл суспензії мікробних клітин - це діапазон тієї кількості носія для іммобілізації мікробних клітин *F. tularensis*, який є необхідним і достатнім для досягнення поставленої задачі. Кількості сорбенту менше 50мг недостатньо для адсорбції на ньому необхідної дози препарату, а при використанні більш, як 100мг сорбенту, збільшується в'язкість вакцини, що затруднює її пероральне застосування.

Використовуваний для одержання пероральних (мукозальних) туляремійних вакцин сорбент (ентеросгель) є біосумісним з тканинами організму людини і тварин, забезпечує концентрацію, швидку доставку до мукозальних рецепторів, пролонговану дію адсорбованих на ньому біологічно активних сполук, в медичній практиці використовується у якості ентеросорбента-детоксиканта [11,12].

У біологічному контролі визначається залишкова вірулентність на білих мишах не тільки сорбованої вакцини, але і базового вакцинного штаму, призначеного для парентерального введення (контроль). При цьому найвища ефективність препарату спостерігалася в умовах залишкової вірулентності для білих мишей при пероральному введенні $10^6 - 10^7$ м.к./мл вакцини, адсорбованої на ентеросгелі - в межах 25 - 30%, а при підшкірному введенні базового (контрольного) вакцинного штаму в дозі $10^3 - 10^4$ м.к./мл залишкова вірулентність складала 60 - 80%, що відповідає вимогам до продуцента живої туляремійної вакцини [9].

Вакцину вводять перорально в об'ємі рідкого наповнювача, що викликає ковтальний рефлекс у суб'єкта, який щеплюється. Важливою особливістю перорального застосування вакцини є те, що такий спосіб введення запропонованої вакцини базується на моделюванні фундаментального у фізіології явища, заснованого на єдності моторики глотки, стравоходу і шлунку, яке спостерігається в певних умовах [10].

Мукозальна (пероральна) туляремійна вакцина, отримана запропонованим способом, запобігає виникненню побічних реакцій, пов'язаних з можливістю алергізації організму у щепленої особи сторонніми білковими продуктами, що містяться в системах культивування і накопичення вакцинного штаму збудника туляремії. Пероральне введення імунобіологічних препаратів, на відміну від парентерального, виключає ризик зараження щеплених осіб такими небезпечними хворобами, як ВІЛ/СНІД, вірусні гепатити та інші інфекції [1]. У порівнянні з прототипом, запропонований спосіб відрізняється спрощеною технологією виробництва вакцин і не передбачає використання дорогих піноутворюючих полімерів, високоактивних імуностимуляторів, нуклеїнових кислот штаму *Francisella tularensis* та очищених поліпептидів цього збудника.

Пероральне введення вакцини дозволить проводити масову імунізацію у відносно короткі проміжки часу, а також сприятиме зниженню залишкової вірулентності туляремійних вакцин та збільшенню тривалості стану несприйнятливості до патогенного штаму туляремії до декількох місяців без додаткової стимуляції імуномодуляторами.

Запропоноване рішення та отриманий з його допомогою продукт (пероральна сорбована жива туляремійна вакцина) не викликає хронічної інфекції, сприяє тривалому збереженню захисту від значних доз патогенного штаму (10^6 м.к./0,25мл), звільненню організму від збудника інфекції. Ці якості одержаної вакцини, на відміну від запропонованого рішення Wise і співавторів, зменшують ризики сенсibilізації організму й виключають його екологічну небезпеку.

Приклад конкретного виконання

Мукозальну (пероральну) туляремійну вакцину готували з вакцинного штаму *Francisella tularensis* Гайського 15 лінії НДІЕГ. Штам культивували на згорнутому жовтковому середовищі Мак-Коя. Контролювали за характером росту і морфології колоній, які мали вигляд звивистого, злегка блискучого майже безбарвного нальоту. У подальшому матеріал висівали на середовище для культивування і виділення туляремійного мікроба (FT-агар). Число SR-колоній імуногенного типу у використовуваних для подальшої роботи культурах складало не менше 75% від загального їх числа. Дводобову культуру з FT-агару змивали фізіологічним розчином (pH=7,2) з подальшим доведенням концентрації мікроорганізмів до заданих параметрів за оптичним стандартом мутності DISK ім. Л. А. Тарасевича (Галузевий стандартний зразок (ГСЗ) - 42-28-59-85).

Відповідно до вказаних нормативних документів готували препарат для визначення показників залишкової вірулентності та імуногенності вакцинного штаму *Francisella tularensis* Гайського 15 лінії НДІЕГ, тобто експериментальну парентеральну туляремійну вакцину в якості контролю. Зазначену експериментальну вакцину в концентрації 1×10^4 мікробних клітин в 0,25мл (м.к./0,25мл) використовували для підшкірного введення тваринам (білі миші). Завись мікроорганізмів 1×10^7 м.к./0,25мл навантажували на носій-сорбент і вводили перорально білим мишам. В якості сорбента-носія використовували гідрогель метилкремнієвої кислоти (ентеросгель) вітчизняного виробництва (МП «Креома», м. Київ) з розрахунку 100 міліграм сорбенту на 1мл мікробної зависі (100мг/мл.). Перед з'єднанням з вакциною сорбент суспендували спочатку в стерильній керамічній ступці, а потім 30 хвилин на магнітній мішалці.

Розмір часток гелю визначали після забарвлення за Грамом. Імерсійну мікроскопію здійснювали при збільшенні 10х90 (мікроскоп Біолам Р11). Розмір часток встановлювали за допомогою окуляр-мікрометра.

Підрахунок кількості часток гелю робили в 25 полях зору. За вказаних умов суспендування розміри часток коївалися в межах від 10 до 75мкм (частки розміром до 25мкм складали більше 50%).

Число адсорбованих клітин на видимій поверхні кожної частки вказаних розмірів визначали під імерсією, після забарвлення за Грамом, як зазначалося вище. Чисельність мікробних клітин на видимій поверхні однієї частки сорбенту складала в середньому 20 мікробних клітин.

Вакциною парентерально в дозі 1×10^4 м.к./0,25мл і перорально в дозі 1×10^7 м.к./0,25мл імунізували по 30 мишей двічі з інтервалом 7 днів. Пероральне введення вакцини здійснювали ненасильницьким шляхом, краплинно. Тварини поступово проковтували всю призначену для прищеплення дозу вакцини. Через один місяць після імунізації всім тваринам підшкірно було введено 1×10^4 м.к./0,25мл вірулентного штаму, що складало близько 100 DLM₁₀₀. Ще через один місяць кожній тварині, що вижила, вірулентний штам був

введений повторно в дозі 1×10^6 м.к./0,25мл. Спостереження за всіма групами тварин вели впродовж усього терміну експерименту, щодня реєстрували загибель мишей і того ж дня проводили розтин, відзначали патоморфологічні зміни внутрішніх органів (печінка, лімфатичні вузли, селезінка, легені). З органів загиблих тварин та з крові готували мазки-відбитки, досліджували їх в світловому та люмінесцентному мікроскопах.

При зіставленні залишкової вірулентності (табл. 1) в групах тварин, імунізованих вихідною та сорбованою вакциною встановлено, що впродовж місяця спостереження найбільша загибель білих мишей зареєстрована в групі імунізованих вихідною (контрольною) вакциною підшкірно в дозі 1×10^6 м.к./0,25мл - 80%. Найменша загибель мишей була в групі тварин імунізованих пероральною вакциною з ентеросгелем в дозі 1×10^7 м.к./0,25мл - 30%.

Таким чином, залишкова вірулентність одержаної вакцини (живої туляремійної адсорбованої вакцини) була в 2,66 разів нижче, ніж залишкова вірулентність вихідної (контрольної) парентеральної вакцини ($p < 0,001$).

За обома методами імунізації у більшості полеглих тварин мазки-відбитки внутрішніх органів (печінка, лімфатичні вузли, селезінка, кров, легені) давали специфічне світіння туляремійних люмінесцентних сироваток, яке свідчить про туляремійну природу інфекту, що викликав загибель тварин внаслідок імунізації ($P < 0,001$).

У групі тварин, імунізованих парентеральною вихідною вакциною в дозі 1×10^4 м.к./0,25мл, вижило 13,33%. У групі тварин імунізованих вакциною, одержаною відповідно до запропонованого способу вижило 40% тварин. Таким чином, запропонована пероральна вакцина з носієм-сорбентом викликала захист в 3 рази більш активно, ніж жива контрольна вакцина при парентеральному введенні ($p < 0,001$) - таблиця 2. З таблиці випливає також, що у мишей, які вижили після першого зараження, при наступному зараженні дозою патогенного штаму в 100 разів вищою від попередньої впродовж місяця від зараження загибелі не спостерігалося.

У всіх загиблих мишей внаслідок зараження вірулентним штамом *Francisella tularensis* №29 у печінці, селезінці, крові, лімфатичних вузлах виявлено специфічне світіння після фарбування мазків цих органів туляремійними люмінесцентними сироватками. Вказані дані свідчать про те, що загибель тварин була викликана патогенним штамом збудника туляремії ($p < 0,001$).

У всіх виживших тварин після імунізації і двократного зараження протягом місяця після останнього зараження не спостерігалося будь-яких ознак захворювання. Після усиплення тварин досліджувались їхні органи: печінка, лімфатичні вузли, селезінка, легені. У жодній з 16 обстежених мишей в мазках-відбитках для люмінесцентної мікроскопії не було виявлено специфічного світіння, що дозволяє зробити висновок про відсутність *Francisella tularensis* та її антигенів в організмі тварин, імунізованих і в подальшому заражених патогенним штамом. Результати досліджень дозволяють вважати, що запропонована модель і отриманий з її допомогою продукт (жива туляремійна сорбована вакцина), має порівняно низький рівень залишкової вірулентності і не супроводжується хронічною туляремійною інфекцією у щеплених.

Порівняно з базовим об'єктом - парентеральною живою туляремійною вакциною, яка використовується для вакцинації дотепер, запропонований спосіб має істотні переваги, оскільки використання такої моделі дозволить спростити технологію виробництва, понизити вартість кінцевого продукту і вартість самої вакцинації, як медичного заходу. Економічний ефект має забезпечувати за рахунок економії засобів, що витрачаються при використанні шприців, стерилізаційних заходів, дотриманні умов антисептики при парентеральному способі вакцинації.

Запропонована корисна модель є за своєю суттю новою технологією виготовлення мукозальної сорбованої живої туляремійної вакцини, яка характеризується підвищеною захисною ефективністю, зниженою залишковою вірулентністю, простотою виготовлення, доступністю і простотою застосування в звичайних і екстремальних умовах.

Таким чином, наведені дані свідчать, що розроблені прийоми одержання, контролю і застосування запропонованої туляремійної адсорбованої вакцини є новим ефективним способом підвищення прищепної активності вакцинного штаму *Francisella tularensis* Гайського 15 лінії НДІЕГ, що дозволяє вирішити поставлене завдання.

Таблиця 1

Залишкова вірулентність туляремійної вакцини

№ п/п	Спосіб введення препарату	Доза (м.к./мл)	Чисельність імунізованих білих мишей	Загинуло після першої імунізації		Загинуло після другої імунізації		Всього загинуло після двох імунізацій		Кратність зниження рівня залишкової вірулентності
				абс	%	абс	%	абс	%	
1.	Підшкірний (контроль вакцинного штаму - вихідна вакцина)	10^4	30	1	3,33	23	76,66	24	80,00	-
2.	Пероральний (вакцина з ентеросгелем)	10^7	30	0	0,00	9	30,00	9	30,00	2,66 $t_{2-1}=4,50$ $p < 0,001$

Таблиця 2

Вживання білих мишей після двократної імунізації і двократного зараження наростаючими дозами патогенного штаму збудника туляремії

№ п/п	Спосіб введення препарату	Доза (м.к./0,25мл)	Чисельність імунізованих	Чисельність тварин, що вижили	Всього вижило після двократної імунізації	Кратність підвищення
-------	---------------------------	--------------------	--------------------------	-------------------------------	---	----------------------

			білих мишей				і зараження наростаючими дозами патогенного штаму		рівня захисної ефективності
				Після двох імунізацій	Після першого зараження в дозі 10^4	Після другого зараження в дозі 10^6	абс.	%	
1.	Підшкірний (контроль вакцинного штаму - вихідна вакцина)	10^4	30	6	4	4	4	13,33	-
2.	Пероральний (вакцина з ентеросгелем)	10^7	30	21	12	12	12	40,00	3,00 $t_{2-1}=3,22$ $p<0,001$

Цитовані джерела

1. Воробйов А.А. Фізіологічні шляхи введення антигенів і інших біологічно активних речовин в організм // Імунологія. - №3. - 2002. - С.138-142.
2. Степанов А.В., Марінін Л.І., Воробйов А.А. Аерозольна вакцинація проти небезпечних інфекційних захворювань // Вісник РАМН. 1999. №8.
3. Sandstrom G. The tularemia vaccine // J. Chem. Jechol. Biotechnol. - 1994 Apr 59(4). - p.315-20.
4. Заявка США №20040013688. Vaccines to induce mucosal immunity. Заявник: Cambridge Scientific, Inc. /Wise, Donald L.; Trantolo, Debra J.; Hile, David D.; Doherty, Stephen A; July 3. 2003.
5. Олсуф'єв Н.Г., Шлигіна К.Н. Моделювання не смертельної туляремійної інфекції у високочутливих до неї гризунів при аліментарному зараженні // Журн.мікробіол. - 1977. - №6. -С.125-126.
6. Tranvik A, Ericsson M, Golovliov I et al. Orchestration of the protective immune response to intracellular bacteria: Francisella tularensis as a model organism // FE MS Immunol. Med. Microbiol. - 1996 Mar; 13(3). - p.221-225.
7. Цимбалістова М.В., Повлович Н.В., Сорокін В.М. Здатність авірулентних форм Francisella tularensis до дисемінації і проліферації в організмі // Журн.мікробіол. - 1996. - №2. - С.10-13.
8. Скрипченко Г.С. Значення вчення Л.В. Громашевського про спільність еволюції паразитичних видів для розвитку сучасної вакцинології // Інфекційні хвороби. - 2003. -№2.- С.75-80.
9. Олсуф'єв Н.Г. Таксономія, мікробіологія і лабораторна діагностика збудника туляремії. М.: Медицина. - 1975. - С.192.
10. Матросова Є.Н. Рухова діяльність шлунку і її зв'язок з секрецією шлункового соку.: М.Ленінград: Наука. - 1969.- С.144.
11. Шевченко Ю.Н., Беляева О.А. Перспективи створення препаратів сорбційно-детоксикаційної дії на основі пористих кремнійорганічних матриць. В кн.: Біосорбційні методи і препарати в профілактичній та лікувальній практиці. Перша науково-практична конференція (14 лютого 1997р., м. Київ). Збірник наукових праць.: - Київ, 1997. - С.10-15.
12. Ентеросгель. Інструкція по застосуванню. Затверджено МОЗ України. Наказ №226 від 21.05.03. Реєстраційне поріднення № П. 05.03/06687.