

К.Е. Боранбаева

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПАСТЕРЕЛЛ

В представленной статье приводятся результаты исследования морфологических и биохимических свойств пастерелл выделенных из поступивших проб. Нашей задачей было изучить и сравнить результаты данных многих авторов.

Ключевые слова: Полужидкий агар, бактериология, пастерелла, пастереллез, плеоморфизм, возбудитель, капсула.

К.Е. Boranbayeva

MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES PASTEURELLA.

In the present article presents results of a study of morphological and biochemical properties of Pasteurella isolated from samples received. Our objective was to study and compare the results of these many authors.

Key words: semi-solid agar, bacteriology, Pasteurella, pasteurellosis, pleomorphism, the causative agent, capsule.

УДК: 619: 616.615:37

**Гоцкина Т.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Умралина А.Р., Еспембетов Б.А.,
Зинина Н.Н., Кыдырбаев Ж.К., Табынов К.К.**

¹ РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК РК п.г.т. Гвардейский, Жамбылская область, Республика Казахстан

² Институт биотехнологии Национальной академии наук Кыргызской Республики,
г.Бишкек

ПОДБОР АДЪЮВАНТОВ ДЛЯ НОВОЙ ВЕКТОРНОЙ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ГРИППА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ АНТИГЕНЫ V.ABORTUS

Аннотация

В данной работе представлены результаты подбора адъювантов для новой векторной противобруцеллезной вакцины на основе вируса гриппа, экспрессирующих антигены V.abortus. Установлено, что новый кандидат вакцины против V. abortus - состоящий из смеси рекомбинантного вируса гриппа А, экспрессирующий рибосомальный белок L7/L12 и Omp16, при испытании на морских свинках наилучшей протективной эффективностью обладает с адъювантом Montanide Gel01, которая по данному показателю была сопоставима с коммерческой вакциной V. abortus S19

Ключевые слова: бруцеллез, векторная вакцина, адъювант, иммуногенность, протективность, морские свинки

Введение

Бруцеллез представляет собой мировую проблему для здравоохранения и животноводства. Среди инфекционных болезней бруцеллез сельскохозяйственных животных занимает особое место, его удельный вес в инфекционной патологии

составляет 43 %. Миграции способствуют чаще всего совместное содержание или совместный выпас разных видов животных [1-4]. Появление бруцеллеза в хозяйстве в значительной степени тормозит воспроизводство стада в связи с абортами, рождением нежизнеспособного плода и яловостью зараженных животных [5, 6].

Профилактика этого опасного заболевания среди КРС в настоящее время проводится с использованием живых аттенуированных вакцин из штаммов *V. abortus* S19 и RB 51. Однако используемые в ветеринарной практике вакцины не обеспечивают 100 % защиту животных от бруцеллеза, ни одна из существующих вакцин не считается совершенной. Проблемным вопросом считается также отсутствие точного критерия определения поствакцинального иммунитета от постинфекционного [7]. Перечисленные недостатки вакцин являются одним из причин широкого распространения в настоящее время бруцеллеза, как среди крупного рогатого скота, овец, так и среди населения Казахстана [8].

Поэтому разработка эффективной и вместе с тем безопасной вакцины против бруцеллеза КРС на сегодня является актуальной проблемой.

В НИИПББ для решения данной проблемы, представляющей большую эпидемиологическую значимость для Казахстана, ведутся работы по созданию живой векторной вакцины против бруцеллеза КРС на основе вируса гриппа. С этой целью впервые были получены рекомбинантный вирус гриппа А субтипов H5N1 и H1N1, экспрессирующие бруцеллезные рибосомальный белок L7/L12 и поверхностный мембранный белок Omp16. Для повышения эффективности вакцины для крупного рогатого скота было решено прибегнуть к подходу, способному существенно повысить протективность препарата, а именно добавление адъювантов, для повышения иммуностимулирующего ответа, который выполняет ключевую роль в противобруцеллезном иммунитете.

На сегодняшний день имеется большой выбор новых коммерческих готовых адъювантных продуктов, а также адъювантов на стадии разработки и испытаний, предназначенных для разных видов животных, направленных на инициацию различных типов иммунного ответа, сочетающих в себе различные уровни показателей эффективности и безопасности. Поэтому исследования по включению различных типов адъювантов в состав вакцин весьма актуальны, их проводят большинство компаний мира, занимающихся производством биопрепаратов для ветеринарии и медицины [9, 10, 11].

В предыдущей работе для подбора адъюванта к векторной вакцине против бруцеллеза нами в качестве сравнения были использованы адъюванты Montanide Gel01 и хитозан. Наивысший уровень защиты был показан с Flu-L7/L12-Omp16-Montanide Gel01 при конъюнктивальном способе введения у КРС; эффективность вакцинации составила 100%. Самая низкая эффективность вакцинации (40%) наблюдалась у КРС, вакцинированного векторной вакциной Flu-L7/L12-Omp16-chitosan [12].

В данной работе для разработки новой векторной вакцины нам были предложены другие коммерческие адъюванты для сравнения с предыдущими данными. Настоящая работа является продолжением серий исследований направленных на разработку эффективной и безопасной вакцины против *V. abortus*.

Материалы и методы

Приготовление образцов вакцины

Образцы вакцин были подготовлены из смеси вирусных конструкций Flu-NS1-124-L7/L12-H5N1, Flu-NS1-124-Omp16-H5N1, накопленных в 10-суточных куриных эмбрионах (КЭ) при температуре 34°C в течение 48 ч. Полученный вирусосодержащий материал вирусных конструкций объединены в смесь следующих штаммов FLU-NS1-124-Omp 16+FLU-NS1-124-L7/L12 в соотношении 1:1, чтобы получить бивалентную вакцинную формуляцию для векторной вакцины [12, 13]. Получившуюся смесь вирусных конструкций растворяли с такими коммерческими и экспериментальными

адьювантами, Montanide Gel01 (Seppic, France), V+XC55 (Россия) и Advax™ (Австралия) по инструкции изготовителя.

Лабораторные животные и дизайн исследований

В исследованиях использованы 42 беспородные морские свинки, весом 300-350 граммов. Морские свинки методом рандомизации были равномерно распределены на 6 групп: четыре опытные, вакцинированные векторной вакциной против бруцеллеза с использованием подкожного способа введения с такими адьювантами приготовленных как растворитель, это Montanide Gel01 (Seppic, France), V+XC55 (Россия) (n=21) и внутримышечного (n=7) методов введения Advax™ (Австралия) по инструкции изготовителя, одна контрольная негативная (ФБР, n=7) и одна контрольная позитивная (*B. abortus* S19, n=7) группы. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по весу тела. Животные на протяжении всего опыта имели свободный доступ к воде и стандартному корму для грызунов.

Вакцинация морских свинок векторной вакциной проводилась однократно подкожным, внутримышечным методами с использованием следующих образцов: смесь вирусных конструкций, экспрессирующих бруцеллезные белки Omp16 и L7/L12 (без адьюванта); вирусные конструкции, содержащие коммерческий адьювант Montanide Gel01 (Seppic, France), экспериментальный пептидный адьювант V+XC55 (Россия), а также коммерческий адьювант Advax™ (Австралия). Детальная схема иммунизации животных показана в таблице. Морским свинкам из группы негативного контроля в качестве инокулята вводили ФБР, а животным из группы позитивного контроля коммерческую вакцину *B. abortus* S19 в дозе 2×10^9 КОЕ/животное (подкожно).

Таблица – Схема иммунизации векторной вакциной против *B. abortus* с использованием разных адьювантов

№	Наименование вакцины	Коли - чество животных в группе	Способ введения и объем инокулята	Доза прайм вакцинации H5N1
1	Смесь FLU-NS1-124-Omp 16+FLU-NS1-124-L7/L12	7	Подкожно по 1 мл	7,0 \log_{10} ЭИД ₅₀ /животное
2	Смесь FLU-NS1-124-Omp 16+FLU-NS1-124-L7/L12 с адьювантом Montanide Gel 01 (10%)	7	Подкожно по 1 мл	7,0 \log_{10} ЭИД ₅₀ /животное
3	Смесь FLU-NS1-124-Omp 16+FLU-NS1-124-L7/L12 с адьювантом V+XC55 (20 мкг/доза)	7	Подкожно по 1 мл	7,0 \log_{10} ЭИД ₅₀ /животное
4	Смесь FLU-NS1-124-Omp 16+FLU-NS1-124-L7/L12 с адьювантом Advax™ (2 мкг/доза)	7	Внутримышеч - по 1 мл	7,0 \log_{10} ЭИД ₅₀ /животное
5	Контроль (ФБР)	7	-	-

Оценка иммуногенности образцов вакцины по наличию антител к гриппозным векторам

Один из параметров оценки иммуностимулирующей эффективности подобранных адьювантов заключался в определении иммуногенности самих гриппозных векторов в составе различных образцов вакцин. Для этого у всех привитых морских свинок на 21

сутки после вакцинации отбирались образцы сыворотки крови для исследования в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с целью выявления титра антигемагглютинирующих антител к гриппозным векторам. РТГА ставили по методике, описанной в наших ранних работах [14, 15].

Оценка протективности образцов вакцины

Оценку протективности образцов вакцин определяли путем контрольного заражения вакцинированных морских свинок (на 21 день после вакцинации) вирулентным штаммом *V. abortus* 544 подкожным способом в дозе 50 КОЕ/животное. На 30 сутки после контрольного заражения все морские свинки были умерщвлены с помощью CO₂ асфиксии, вскрыты в асептических условиях для взятия следующих органов: заглочный, нижнешейный, правый паховый, левый паховый и парааортальный лимфатические узлы, печень, почку, селезенку и костный мозг. Из изъятых органов делали посеы в пробирки со средой триптоз-соевого агара (ТСА). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 4 недель, в период которых периодически проводили учет роста бактериальных культур. Результаты бактериологического исследования оценивали индивидуально на животное по количеству органов, из которых выделялись культуры бруцелл (индекс инфицированности). Для сравнительного анализа рассчитывали среднее значение показателя индекса инфицированности на группу животных.

Статистическая обработка

Определяли среднеарифметические значения исследуемых параметров, а также их стандартную ошибку. Достоверность различий между показателями определяли с использованием статистической программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Значение $P < 0,05$ считали значимым.

Результаты и обсуждение

Иммуногенность векторной вакцины против КРС с различными адъювантами

В экспериментальных условиях на лабораторных морских свинках установлено, что изготовленные образцы вакцин на основе разных типов адъювантов обладают различной антигенной активностью, что обусловлено различием в титрах специфических антител у иммунизированных животных. Показано, что наиболее антигенно активным оказался вариант вакцины, изготовленный с включением адъюванта MONTANIDE GEL 01 (рисунок 1). Титры антител в РТГА в этой группе животных составил $1:580 \pm 170,4$ и было статистически достоверно выше ($P \leq 0,05$) по сравнению с другими группами, привитых образцами вакцин с такими адъювантами как V+XC55 (20 мкг/доза) средний геометрический титр показал $1:250 \pm 42,6$ и Advax TM (2 мкг/доза) $1:256 \pm 112,8$ соответственно. В негативной контрольной группе животных антигемагглютинирующие антитела не обнаруживались (данные не показаны).

$P < 0.05$

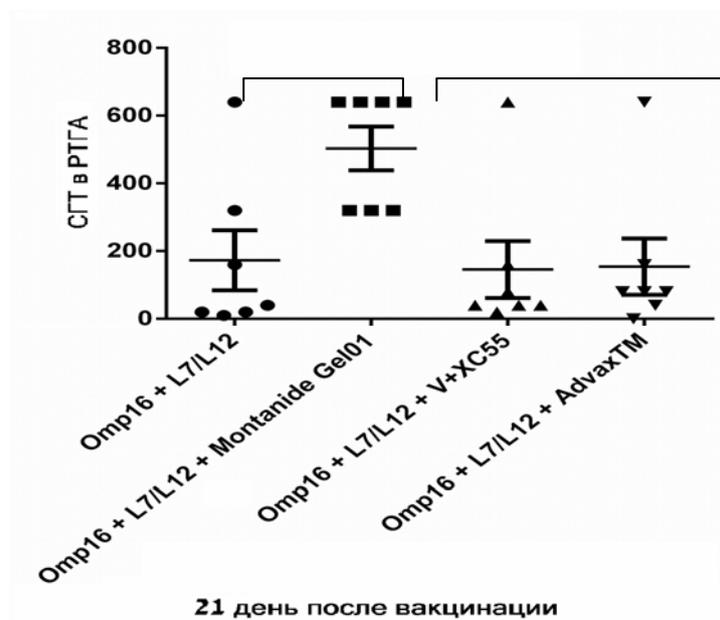


Рисунок 1- Титры антиагглютинирующих антител у морских свинок, привитых однократно векторной вакциной на основе разных типов адъювантов. Приведены среднегеометрические титры (СГТ) антител \pm стандартная ошибка (СО) для каждой группы, состоящей из 7 морских свинок.

Протективность образцов вакцин от вирулентного штамма *V. abortus* 544

Наиболее важным этапом настоящих исследований являлось оценка протективности векторной вакцины в зависимости от используемого адъюванта. Результаты проведенных исследований показали (рисунок 2), что все образцы векторной вакцины вне зависимости от использованного адъюванта или без него обеспечивали достоверную защиту ($P \leq 0.05$) привитых морских свинок от *V. abortus* инфекции.

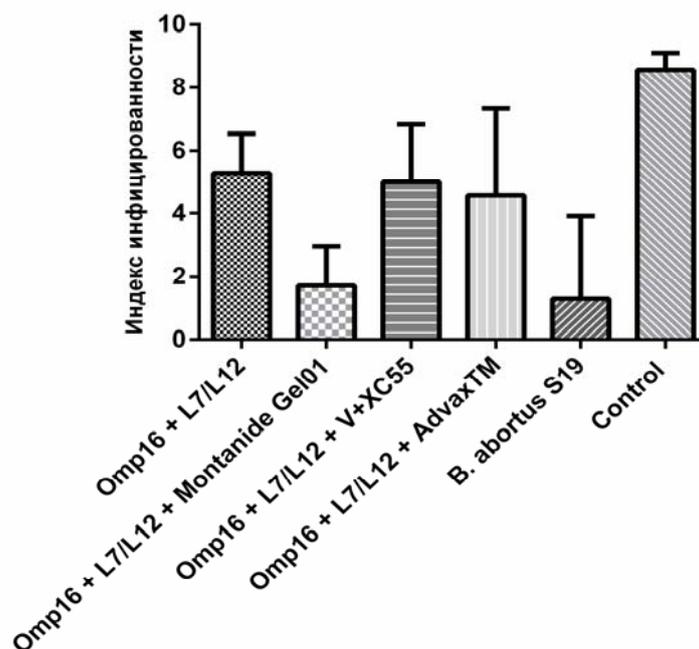


Рисунок 2- Индекс инфицированности у морских свинок, привитых однократно векторной вакциной против *V. abortus* на основе разных типов адъювантов. Контрольное заражение привитых морских свинок проводилась вирулентным штаммом *V. abortus* 544

Образцы векторной вакцины, содержащие адъюванты, по показателю протективности демонстрировали более высокие результаты, однако при этом статистически достоверной разницы ($P \leq 0.05$) между ними не наблюдалось. Следует отметить, что все образцы векторной вакцины, за исключением образца с адъювантом Montanide Gel01 по индексу инфицированности достоверно ($P \leq 0.05$) уступали коммерческой вакцине *B. abortus* S19. Результаты проведенных исследований показали, что среди испытанных адъювантов наиболее эффективным в плане повышения протективности является Montanide Gel01, который в составе векторной вакцины у привитых морских свинок обеспечивал защиту, сопоставимую ($P \leq 0.05$) с коммерческой вакциной *B. abortus* S19.

Заключение

Таким образом, можно заключить, что предлагаемый нами новый кандидат вакцины против *B. abortus* - состоящий из смеси рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих рибосомальный белок L7/L12 и Omp16, в сочетании с различными адъювантами и без них обладает хорошей протективностью на модели морских свинок. При этом наилучшие результаты по иммуногенности и протективности достигнуты с образцом векторной вакцины, содержащей адъювант Montanide Gel01, который в плане обеспечения защиты от *B. abortus* 544 инфекции был сопоставим с коммерческой вакциной *B. abortus* S19.

Литература

1. Козловский С.В., Емельяненко П.А. / Ветеринарная микробиология. - М.: Колос. - 1982. - С. 304.
2. Колычев Н.М., Росманов Р.Г. / Ветеринарная микробиология и иммунология. - М.: Колос. - 2003 – С. 432.
3. Асонов Н.Р. / Микробиология. - М.: Колос. - 2002. – С 350.
4. Moore D.A., Carpenter T.E. Spatial analysis methods and geographic information systems: use in health research and epidemiology // *Epidemiol. Rev.* - 1999. - Vol. 21. - P. 143-161.
5. Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. / Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий. - Л.: Медицина. - 1981. – С. 304.
6. Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И. Конструирование слабоагглютиногенных вакцин против бруцеллеза // *Международ. рабоч. Сопещение: Бруцеллез - пограничная инфекция животных и человека, требующая общих усилий разных стран.* - Серпухов. - 2008. - С. 15-16.
7. Schurig G.G., Sriranganathan N., Corbel M.J. Brucellosis vaccines: past, present and future // *Vet Microbiol.* - 2002. - Vol. 90. - P. 479-496.
8. Ashford D.A., di Pietra J., Lingappa J., Woods C., Noll H., et al. Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51 // *Vaccine.* - 2004. - Vol.22. - P. 3435-3439.
9. Мамков, Н.С. Масляные адъюванты для противоящурных вакцин: автореф. дисс. докт. вет. наук / Н.С. Мамков.- Владимир. 1999.- 19с.
10. Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 1999.- №5. P. 1249-1255.
11. Niblack J.F., Otterness I.G., Hemsworth G.R., Wolff J.S., Hoffman W.W. and Kraska A.R. CP-20,961: a structurally novel, synthetic adjuvant. *J. Reticuloendoth. Sot.* 1979. - №26. P. 655-666.
12. Tabynov K., Kydyrbayev Zh., Ryskeldinova Sh., Yespembetov B., Zinina N., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarbekov D., Gotskina T., Sansyzbay A. Novel influenza virus vectors expressing *Brucella* L7/L12 or Omp16 proteins in cattle induced a

strong T-cell immune response, as well as high protectiveness against *B. abortus* infection // *Vaccine*. – 2014. - № 32 (18): 2034-41.

13..Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Yespembetov B., Syrymkyzy N., Akzhunusova I., Sansyzbay A. Safety of the novel vector vaccine against *Brucella abortus* based on recombinant influenza viruses expressing *Brucella* L7/L12 and OMP16 proteins, in cattle. – *J. Vaccines Immun.* – 2014. – 1: 101.

14.Tabynov K., Kydyrbayev Z., Sansyzbay A., Khairullin B., Ryskeldinova S., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarbekov D. Immunogenic and protective properties of the first Kazakhstan vaccine against pandemic influenza A (H1N1) pdm 09 in ferrets.// *Virol Sin.* – 2012. № 27(6): 345-52.

15. Tabynov K., Sansyzbay A., Kydyrbayev Z., Yespembetov B., Ryskeldinova S., Zinina N., Assanzhanova N., Sultankulova K., Sandybayev N., Khairullin B., Kuznetsova I., Ferko B., Egorov A. Influenza viral vectors expressing the *Brucella* OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. // *Virol J.* – 2014. – 11(1): 69.

Гоцкина Т.М., Рыскельдинова Ш.Ж., Умралина А.Р., Еспембетов Б.А.,
Зинина Н.Н., Қыдырбаев Ж.Қ., Табынов Қ.Қ.

ТҰМАУ ВИРУСЫНЫҢ *B. ABORTUS* АНТИГЕНІН ЭКСПРЕССИЯЛАЙТЫН БРУЦЕЛЛЕЗГЕ ҚАРСЫ ЖАҢА ВЕКТОРЛЫҚ ВАКЦИНАҒА АДЬЮВАНТТАРДЫ ТАҢДАП АЛУ

Бұл жұмыста тұмау вирусының *B. abortus* антигенін экспрессиялайтын бруцеллезге қарсы жаңа векторлық вакцинаға адьюванттарды таңдап алу нәтижелері көрсетілген. *B. abortus*-қа қарсы вакцинаға жаңа кандидат L7/L12 немесе Omp16 рибосомалдық белоктарын экспрессиялайтын рекомбинантты А тұмау вирустарының қоспаларын теңіз шошқаларында сынауда, протективтік тиімділігі бойынша Montanide Gel01 адьюванты ең жоғары нәтижеге қол жеткізді және *B. abortus* S19 коммерциалық вакцинасымен салыстырғанда алынған көрсеткіштер бірдей екенділігі анықталды.

Кілт сөздер: бруцеллез, векторлық вакцина, адьювант, иммуногенділігі, протективтілігі, теңіз шошқалары.

Gotskina T.M., Ryskeldinova S.Z., Umralina A.R., Yespembetov B.A., Zinina N.N.,
Kydyrbayev Z.K., Tabynov K.K.

SELECTION OF ADJUVANTS FOR A NEW VECTORIAL ANTIBRUCCELLAR VACCINE ON THE BASIS OF INFLUENZA VIRUSE EXPRESSING ANTIGENS OF *B.ABORTUS*

This paper presents the results of the selection of adjuvants for a new vectorial antibrucellar vaccine on the basis of influenza viruses expressing antigens of *B.abortus*. It is found that the new vaccine candidate against *B. abortus* consisting from a mixture of recombinant influenza virus A expressing the ribosomal protein of L7/L12 and Omp16, at testing on guinea pigs the best protective efficacy has with the adjuvant of Montanide Gel01, which in this figure was comparable with the commercial vaccine of *B. abortus* S19.

Key words: brucellosis, vectorial vaccine, adjuvant, immunogenicity, protectivity, guinea pigs.