

Рыскельдинова Ш.Ж., Табынов К.К., Сазыкулова Г.Д., Еспембетов Б.А., Зинина Н.Н.
ПРИ МҮЙҮЗДҮҮ МАЛДЫН В. АВОРТУСНА КАРШЫ ВЕКТОРДУК ВАКЦИНА
КОЛДОНУУДА ПРОТЕКТИВДИК ЖООБУН ИЗИЛДӨӨ

Рыскельдинова Ш.Ж., Табынов К.К., Сазыкулова Г.Д., Еспембетов Б.А., Зинина Н.Н.
ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У КРУПНОРОГАТОГО
СКОТА ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ВЕКТОРНОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ В. АВОРТУС

Sh. Zh. Ryskeldinova, K.K. Tabynov, G.Dj. Sazykulova, B.A. Espembetov, N.N.Zinina

STUDYING OF PROTECTIVE IMMUNE RESPONSE OF CATTLE AFTER
VACCINATION BY VECTOR VACCINE AGAINST V. ABORTUS

УДК: 619:616.981.42

Эң жакшы протективдүүлүк көрсөткүчтөрү адьювант Montanide Gel01 үлгүсүндөгү вакцинада экендиги тастыкталды. Вакцинанын натыйжалуулук көрсөткүчү жана жугуштуктуулуктун индекси 100% жана 0 түздү. Ошондой эле натыйжалуулук көрсөткүчү адьювантсыз вакцинаны колдонууда да алынды (60%), ал эми жугуштук индекси боюнча *V. abortus* 19 коммерциялык вакцинага караганда начар экендиги байкалды.

Негизги сөздөр: бруцеллез, рекомбинанттуу штамм, вектордуу вакцина, бактериология, серология, деңиз чочкочосу, ак чычкандар.

Установлено, что наилучшие показатели по протективности достигнуты с образцом вакцины, содержащим адьювант Montanide Gel01. Эффективность вакцинации и индекс инфицированности при этом составили 100 % и 0, соответственно. Хорошие результаты получены и при применении вакцины без адьюванта, которые по показателю эффективности вакцинации были одинаковы (60 %), а по индексу инфицированности несколько уступали коммерческой вакцине *V. abortus* 19.

Ключевые слова: бруцеллез, рекомбинантный штамм, векторная вакцина, бактериология, серология, морские свинки, белые мыши.

It has been demonstrated that the best indicators on protective are reached with the vaccine sample containing Montanide Gel01 adjuvant. Efficiency of vaccination and contamination index was 100% and 0, respectively. Good results are obtained and application of vaccine without adjuvant which on indicator of vaccination efficiency were equally (60%) and on contamination index were conceded to commercial vaccine of *V. abortus* 19.

Key words: brucellosis, recombinant strain, vector vaccines, bacteriology, serology, guinea pigs, white mice.

Введение

Бруцеллез крупного рогатого скота – хроническое зооантропонозное заболевание, распространенное во многих странах мира, наносящее большой экономический ущерб животноводству и представляющее серьезную опасность здоровью людей [1,2].

Возбудитель бруцеллеза относится ко II группе патогенности, пути и факторы передачи инфекции разнообразны, человек в любом возрасте высоковосприимчив к бруцеллезу, заболевание длительное, трудно поддающееся лечению, поражает практически все органы и системы организма и, как правило, сопровождается хронизацией инфекционного процесса с нередкой последующей инвалидностью больного [2,3].

Несмотря на столетнюю историю открытия возбудителей этой инфекции и, соответственно, столь же длительную историю объединения усилий ученых разных стран, направленных на разработку и совершенствование средств и методов борьбы с ним, бруцеллез все еще остается одной из главных проблем мировой медицинской и ветеринарной науки.

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. Перечисленные недостатки вакцин являются одним из причин широкого распространения в настоящее время бруцеллеза, как среди крупного рогатого скота, овец, так и среди населения Казахстана.

Учитывая то, что *V. abortus* является внутриклеточным патогеном, основным критерием, предъявляемым к новым кандидатным вакцинам, является их способность формировать клеточный иммунный ответ у животных.

В попытках создать эффективный Th1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный противобруцеллезные иммунные ответы различными исследовательскими группами были разработаны субъединичные (рекомбинантные протеины) [4-6] и ДНК-вакцины [7-9].

В НИИПББ методом обратной генетики сконструированы новые рекомбинантные штаммы вируса гриппа А (гриппозные векторы) субтипов H5N1 и H1N1, содержащие генетические последовательности вставок бруцеллезных белков L7/L12 (рибосомальный) или Omp16 (поверхностный мембранный) в *NSI* гене, экспрессия которых происходит *in vivo*. Полученные рекомбинантные вирусы гриппа А субтипов H5N1 и H1N1, экспрессирующие рибосомальный белок L7/L12 или Omp16, в режиме двукратной иммунизации у лабораторных животных формируют бруцелла-специфичный гуморальный и Th1 клеточный иммунные ответы, а главное обеспечивают высокую степень протективности сопоставимой с коммерческой вакциной *V. abortus* 19 [10-12].

Данные исследования были посвящены изучению иммуногенности у КРС после вакцинации векторной вакциной против *V. abortus*.

Материалы и методы

Для иммунизации КРС использовали:

- векторную вакцину против бруцеллеза КРС из рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Omp16 и L7/L12 субтипа H5N1;

- векторную вакцину против бруцеллеза КРС из рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Omp16 и L7/L12 субтипа H1N1;

- коммерческую вакцину против бруцеллеза из штамма *B. abortus* S19S (Щелковский биокомбинат, Россия);

- эпизоотический штамм *B. abortus* 544;

- Роз-бенгал тест (РБТ, Антиген, Казахстан);

- реакции агглютинации (РА, Микроген, Россия);

- реакции связывания комплемента (РСК, Микроген);

- иммуноферментный анализ (ИФА, Brucella-Ab C-ELISA, Svanova Biotech AB, Sweden).

Крупный рогатый скот

В исследованиях использованы 15 голов КРС (нетели), местной породы, в возрасте 1,5-2 года. Все животные были серонегативны *B. abortus*, что было подтверждено путем исследования сывороток крови в Роз-бенгал тесте (РБТ, Антиген, Казахстан), реакции агглютинации (РА, Микроген, Россия), реакции связывания комплемента (РСК, Микроген) и иммуноферментном анализе (ИФА, Brucella-Ab C-ELISA, Svanova Biotech AB, Sweden), которые ставили в соответствии с инструкциями производителя.

Нетели методом рандомизации были равномерно распределены на 5 групп: три опытные (n=9), вакцинированные бивалентными вирусными конструкциями (образцы без адьюванта и с адьювантами), одна контрольная (n=3) негативная группа (ФБР) и одна контрольная позитивная (*B. abortus* S19) группа. Животные на протяжении всего опыта содержались изолированно друг от друга и имели свободный доступ к воде и корму.

Иммунизация КРС

Нетели опытных групп с использованием сочетанного конъюнктивного (К.) и подкожного (П.К., в область шеи) методов введения были двукратно с интервалом в 30 суток привиты смесью рекомбинантных вирусов гриппа А субтипов H5N1 (прайм вакцинация) и H1N1 (бустерная вакцинация), экспрессирующих бруцеллезные белки L7/L12 и Omp16. Детальная схема иммунизации животных показана в таблице 2. Нетелей из группы позитивного контроля иммунизировали однократно П.К. в область шеи вакцинным аттенуированным штаммом *B. abortus* S19 (Щелковский биокомбинат, Россия) в дозе 80 x 10⁹ КОЕ/животное. Нетелям из группы негативного контроля в качестве инокулята вводили ФБР.

Таблица 1 - Схема иммунизации КРС (нетели) смесью вирусных конструкций

Вакцина	Способ введения*	Кол-во животных	Доза прайм вакцинации (H5N1), log ₁₀ ЭИД ₅₀ /животное	Доза бустерной вакцинации (H1N1), log ₁₀ ЭИД ₅₀ /животное
Векторная вакцина против бруцеллеза КРС без адьюванта	К. П.К.	3	8,74+8,74	8,5+8,25
Векторная вакцина против бруцеллеза КРС + адьювант Montanide Gel01	К. П.К.	3	8,64+8,64	8,4+8,15
Векторная вакцина против бруцеллеза КРС + адьювант хитозан	К. П.К.	3	8,43+8,43	8,2+7,95

Примечание – «*» объем вакцины для нетелей при К. и П.К. способах введения составлял 1 и 3 мл соответственно

Испытание протективности образцов вакцин на КРС

На 30 сутки после бустерной вакцинации КРС опытной (n=9) и негативной контрольной (n=3) групп (ФБР) были заражены вирулентным штаммом *B. abortus* 544 подкожным способом в дозе 5 x 10⁸ КОЕ/животное. Контрольное заражение КРС из группы позитивного контроля (n=3) проводилось аналогичным способом на 60 сутки после однократной иммунизации вакцинным штаммом *B. abortus* S19. На 30 сутки после контрольного заражения все животные были умерщвлены и вскрыты в асептических условиях для взятия лимфатических узлов: подчелюстной, заглоточный, правый предлопаточный, левый предлопаточный, правый паховый, левый паховый, средостенный, бронхиальный, порталный, параортальный, тазовый, надвыменный, брыжеечный, а также проб из паренхиматозных органов: печень, почка, селезенка и костный мозг. Всего с каждого животного отбиралось по 17 проб. Из изъятых органов делали посевы в пробирки со средой триптоз - соевого агара (ТСА). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 4 недель, в период которых периодически проводили учет роста бактериальных культур. Животное считалось заразившимся, если хотя бы из одного органа высевалась культура бруцелл. Результаты бактериологического исследования оценивали по количеству КРС, от которых не выделены культуры (эффективность вакцинации), по количеству культур на одно заразившееся животное и по интенсивности обсеменения (инфицированность) организма животных, которую вычисляли по формуле (1).

$$x = \frac{a \times 100}{b \times c} \tag{1}$$

где, x - индекс инфицированности (И.И.);
a - число выделенных культур;

в - число морских свинок в опыте;

с - число органов и лимфатических узлов, взятых для посева.

Статистическая обработка результатов исследования

Использовались общепринятые способы статистической обработки экспериментально полученных выборок варьирующих переменных. Определяют среднее значение выборки (X), среднеквадратичную ошибку (m). Достоверность различий между показателями ($p < 0,05$) определяли с применением критерия Стьюдента и ANOVA.

Результаты исследования

Иммуногенность образцов векторных вакцин на КРС

Следующий и наиболее важный этап наших исследований был посвящен изучению протективности образцов вакцин на КРС после контрольного заражения эпизоотическим штаммом *B. abortus 544*. Протективность образцов вакцин из вирусных конструкций проводили в сравнении с коммерческой бактериальной вакциной *B. abortus S 19* с использованием таких параметров как эффективность вакцинации и индекс инфицированности. Результаты исследования представлены в рисунке 1.

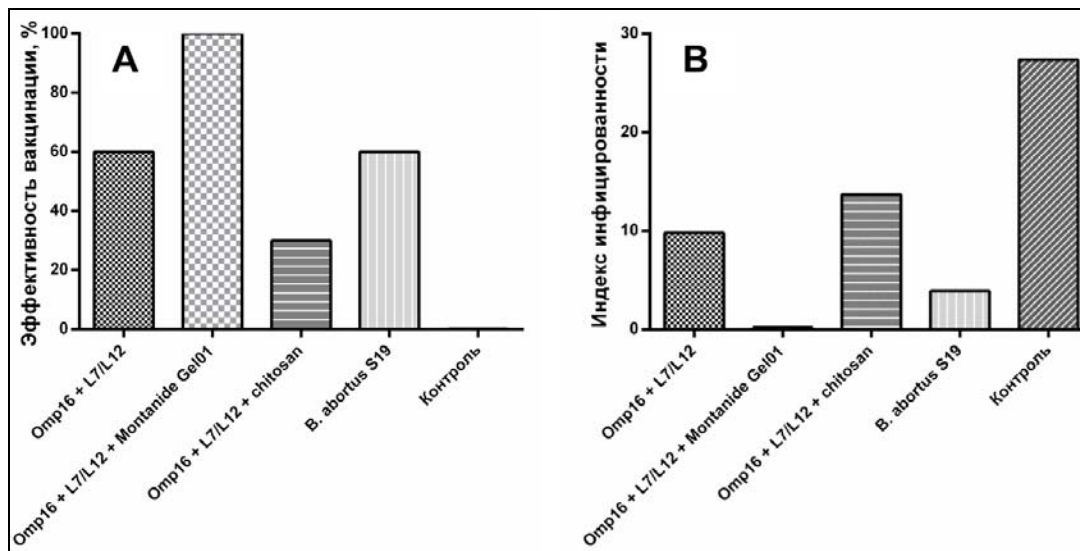


Рисунок 1 - Протективность образцов вакцин на КРС, оцениваемая по параметрам эффективности вакцинации (А) и индекса инфицированности (В)

По результатам исследований установлено (рис.1), что наилучшие показатели по протективности достигнуты с образцом из вирусных конструкций, содержащим адъювант Montanide Gel01.

Эффективность вакцинации и индекс инфицированности при этом составили 100% и 0, соответственно. Хорошие результаты получены и при применении просто вирусных конструкций, которые по показателю эффективности вакцинации были одинаковы (60 %), а по индексу инфицированности несколько уступали коммерческой вакцине *B. abortus*. Из всех испытанных образцов вакцин наилучшие результаты показал препарат, содержащий адъювант хитозан, эффективность вакцинации и индекс инфицированности при этом составили 30 % и 13,7, соответственно.

В контрольной группе КРС индекс инфицированности составил 27,4, штамм *B. abortus 544* в среднем выделялся от 5 из 17 исследованных органов (лимфатические узлы и паренхиматозные органы).

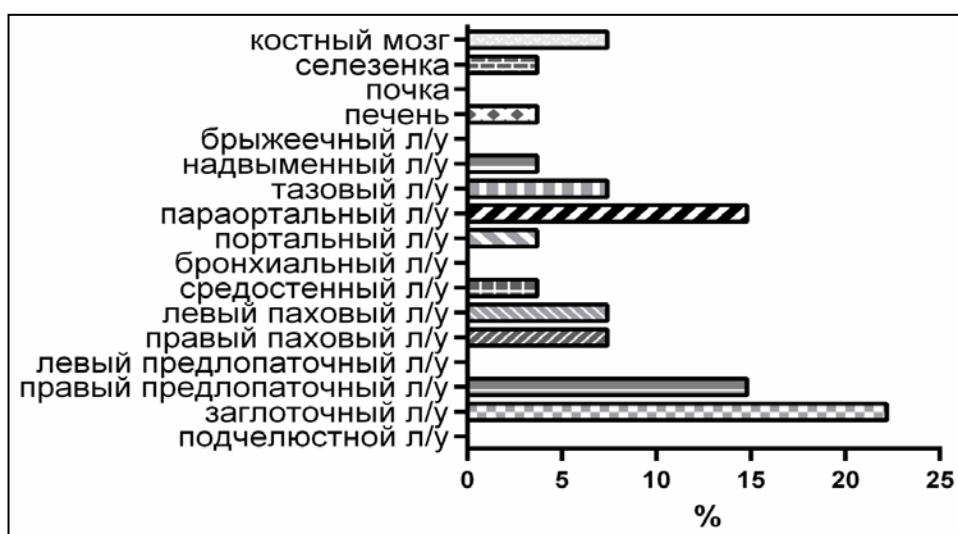


Рисунок 2 – Частота выделения штамма *B. abortus 544* из различных органов животных опытных и контрольных групп после контрольного заражения

В целом по всем опытным и контрольным группам животных (рисунок 2) наиболее частое выделение штамма *B. abortus* 544 после контрольного заражения отмечалось в следующих лимфатических узлах: заглоточный (22,2 %), правый предлопаточный (14,8 %), параортальный (14,8 %), правый и левый паховый (7,4 %), тазовый (7,4 %). В других лимфатических узлах и паренхиматочных органах выделение контрольного штамма было незначительным. Следует отметить, что в таких лимфатических узлах как брыжеечный, бронхиальный, левый предлопаточный и подчелюстной, а также в почке выделение *B. abortus* 544 не отмечалось.

Заключение

Установлено, что наилучшие показатели по протективности достигнуты с образцом вакцины, содержащим адьювант Montanide Gel01. Эффективность вакцинации и индекс инфицированности при этом составили 100 % и 0, соответственно. Хорошие результаты получены и при применении вакцины без адьюванта, которые по показателю эффективности вакцинации были одинаковы (60 %), а по индексу инфицированности несколько уступали коммерческой вакцине *B. abortus* 19.

Литература:

1. Колычев Н.М., Росманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Колос, 2003. – 432 с.
2. Асонов Н.Р. Микробиология. – М.: Колос, 2002. – 350 с.
3. Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И. Конструирование слабоагглютиногенных вакцин против бруцеллеза // Междунар. рабоч. Совещание: Бруцеллез - пограничная инфекция животных и человека, требующая общих усилий разных стран. – Серпухов, 2008. – С. 15-16.
4. Oliveira S.C. and Splitter G.A. CD8⁺ type 1 CD44hi CD45 RBloT lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice // Eur J Immunol. – 1995. – V.25. – P. 2551-2557.
5. Jiang X. and Baldwin C.L. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus* // Infect Immun. – 1993. – V.61 – P. 124-134.
6. Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., et al. Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant // Infect Immun. – 2001. – V. 69. – P. 4816-4822.
7. Kurar E., Splitter G.A. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response // Vaccine. – 1997. – V. 15. – P. 1851-1857.
8. Onate A.A., Cespedes S., Cabrera A., et al. A DNA vaccine encoding Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice // Infect Immun. – 2003. – V. 71. – P. 4857-4861.
9. Luo D., Ni B., Li P., et al. Protective immunity elicited by a divalent DNA vaccine encoding both the L7/L12 and Omp16 genes of *Brucella abortus* in BALB/c mice // Infect Immun. – 2006. – 74. – P. 2734-2741.
10. Tabynov K., Sansyrbay A., Kydyrbayev Z., Yespembetov B., Ryskeldinova S., Zinina N., Assanzhanova N., Sultankulova K., Sandybayev N., Khairullin B., Kuznetsova I., Ferko B., Egorov A. (2014) Influenza viral vectors expressing the *Brucella* OMP16 or L7/L12 proteins as vaccines against *B. abortus* infection. Virol J. 11:69.
11. Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Yespembetov B., Zinina N., Assanzhanova N., Kozhamkulov Y., Inkarebekov D., Gotskina T., Sansyrbay A. (2014) 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. 32(18): 2034-41.
12. Tabynov K., Kydyrbayev Z., Ryskeldinova S., Yespembetov B., Syrymkyzy N., Akzhunusova I. and Sansyrbay A. (2014) 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 1: 101.

Рецензент: к.вет.н. Баракбаев К.Б.