

УДК 616.981.51

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ И АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ РАДИОВАКЦИНЫ

Иванов А.В., Панков Я.Г., Панкова Е.В.

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» г. Казань, Российская Федерация

Путем облучения вакцинного штамма *B. anthracis* 55 γ -лучами ^{60}Co в дозе 20 кГр получен радиоинактивированный вариант вакцинного штамма *B. anthracis* 55 R. Установлено, что иммунизация животных указанной вакциной обеспечивает экстренную 80–100 % защиту животных от экспериментальной сибирской язвы в течение 3–15 дней после иммунизации. Результаты РНГА и ИФА-тестов на основе сенсibilизированных протективным антигеном эритроцитов и энзим-меченого протективного антигена коррелируют с выживаемостью зараженных животных и титры протективных антител в сыворотке крови $3,3\text{--}6,6 \log_2$ в РНГА и $4,7\text{--}9,9 \log_2$ в ИФА обеспечивают 80–100 % защиту животных от экспериментального антракса.

Сибирская язва – сапрозоонозная особо опасная бактериальная инфекционная болезнь с контактным механизмом передачи возбудителя. Резервуаром возбудителя инфекции служит почва. Источник возбудителя – травоядные животные.

Однако, с изменением экологии возбудителя, вызванным интенсификацией сельского хозяйства, поголовной вакцинацией животных индивидуального и общественного секторов, загрязнением внешней среды химическими выбросами и другими социально-экономическими факторами, согласно многочисленным наблюдениям и исследованиям отечественных и зарубежных исследователей отмечается атипичное течение сибиреязвенной инфекции и распространение микробоносительства у животных и людей с присущими ему характерными свойствами [5].

Наиболее подвержены заболеванию: овцы, козы, крупный рогатый скот, лошади. Высоко восприимчивы к сибирской язве лабораторные животные: белые мыши, морские свинки и кролики. Крысы, собаки, свиньи относительно устойчивы к данной инфекции. Переболевшие сибирской язвой животные и люди, в большинстве случаев, становятся невосприимчивыми к повторному заражению возбудителем в результате возникновения постинфекционного иммунитета [1, 3].

Соответственно, существует опасность заражения людей, что еще раз подчеркивает необходимость и обязательность активной профилактики этой болезни у животных. Ни в коем случае не должны снижаться объемы профилактической вакцинации животных в зонах особого риска заражения, в стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктах. Поголовье животных в личных подворьях следует рассматривать, как контингент особого риска.

Однако, несмотря на достоинства разработанных в разные годы антракс-вакцин, многие из них нуждаются в усовершенствовании и улучшении параметров, связанных с иммуногенностью, продукцией протективного антигена (ПА) и реактогенностью.

Из литературных данных известно, что метод инактивации возбудителей с применением γ -лучей перспективен для создания безопасных инактивированных вакцин. Разработка технологии изготовления инактивированного ионизирующим γ -излучением экологически безопасного и иммуногенного вакцинного препарата против сибирской язвы, пригодного для обеспечения экстренной защиты животных от этой инфекции, является актуальной [2].

Цель работы. Целью исследований явилось изучение антигенных и иммуногенных свойств радиоинактивированной сибиреязвенной вакцины.

Материалы и методы. Исследования проводили на культуре вакцинного штамма *B. anthracis* 55, которую выращивали в течение 48 часов на питательной среде, состоящей из 60 % гидролизата плацентарно-эмбрионально-маточного (ГПЭМ), 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота и 20 % воды кипяченной.

Учитывая достаточное количество протективного антигена и других компонентов роста, к выращенной биомассе, с целью стабилизации и предотвращения дальнейшего спорообразования, добавляли формалин (0,4–1,0 % к общему объему биомассы), который одновременно способствует переходу токсина в анатоксин, затем разливали в колбы (флаконы) емкостью 100–500 см³ и подвергали γ -облучению.

Инактивацию клеток сибиреязвенного микроба проводили на γ -установке «Исследователь» с источником излучений ^{60}Co при мощности экспозиционной дозы 1,75 Гр/мин. Клетки облучали в экспозициях 0,31 ч., 1,17 ч., 2,34 ч., 3,10 ч. и 27 ч. соответственно. При этом поглощенная доза составляла 2, 5, 10, 20 и 25 кГр. Степень инактивации микробов определяли методом посева на МПА и в МПБ при 37 °С в течение 3 суток. За радиоинактивирующую дозу γ -лучей принимали ту, которая вызывала гибель исходной микробной культуры за единицу времени, независимо от концентрации микроба в облученном материале.

Для оценки иммуногенной активности радиовакцины проводили опыты на 40 овцах живой массой 35–40 кг, породы «Прекокс», разделенных на 4 группы по 10 животных в каждой.

Первую группу животных иммунизировали инактивированной радиовакциной подкожно, в дозе 5 см³, вторую группу аналогично первой, в дозе 10 см³. Третью группу животных иммунизировали подкожно коммерческой сибиреязвенной вакциной из штамма 55 согласно инструкции в дозе 0,5 см³. Четвертую группу животных не иммунизировали, она служила контролем.

Через 3, 7, 15 сут. после иммунизации животных 1, 2, 3 и 4 группы заражали внутрибрюшинно спорами вакцинного штамма «Ч-7» (15×10^3 спор) в дозе 10 LD₅₀. Заражение животных спорами вирулентного штамма возбудителя сибирской язвы проводили в соответствии с правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». Санитарные правила 1.2.011-94. Категория помещения, в котором проводилась работа, равна BSL-4.

Через 3, 7, 15 и 30 дней после иммунизации и заражения животных, брали пробы крови для определения уровня поствакцинальных антител и учитывали результаты опыта по выживаемости и титру противосибиреязвенных (протективных) антител в сыворотке крови животных. Вакцину считали иммуногенной, если число выживших животных составляло не менее 80 %.

Реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) ставили по К. Мальбергу [4] с использованием сенсibilизированных протективным антигеном (анатоксином) эритроцитов барана. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили по Х. Фримелю и Г. Хольцхайдту [6] с использованием непрямого варианта реакции при помощи меченого пероксидазой хрена протективного антигена.

Результаты исследований. Результаты радиомикробиологических исследований показали, что изучаемая культура оказалась высокорезистентной к γ -лучам ^{60}Co , поскольку полная инактивация микробных клеток наступала при дозе 20 кГр.

Результаты динамического наблюдения за иммунизированными животными испытываемыми вакцинами (*B. anthracis* штамма 55 и *B. anthracis* 55 R) показали, что поствакцинальных осложнений не наблюдали. Зараженные животные после иммунизации вакциной из штамма 55 через 3, 7 сут. тяжело переболели, температура у них повышалась до 41,5–42,0 °C и держалась в течение недели. Животные, привитые радиовакциной из штамма 55 R, чувствовали себя удовлетворительно, температура тела у них была в пределах нормы (40,0–40,8 °C).

Результаты изучения иммуногенности испытываемых вакцин показали, что выживаемость зараженных после иммунизации животных имела существенные различия в зависимости от срока иммунизации и заражения животных. Результаты изучения иммуногенности радиовакцины приведены в таблице. Учитывая, что при дозах 5,0 и 10,0 см³ получены одинаковые результаты, данные по 2-й группе, сочли возможным не приводить. Как показывают приведенные в таблице данные, выживаемость привитых известной вакциной из штамма 55 и зараженных вирулентным штаммом возбудителя сибирской язвы овец через 3 дня после вакцинации составляла 10 %, через 7 дней – 30 % и через 15 дней – 70 %.

Использование радиоинaktivированного варианта вакцины из шт. 55 R уже через 3 дня после иммунизации обеспечивало защиту от сибирской язвы на 80 % зараженных вирулентным штаммом возбудителя антракса животных. Выживаемость зараженных животных возбудителем инфекции через 7 дней после иммунизации вакциной из штамма 55 R составляла 90 % против 30 % иммунизированных овец вакциной из штамма 55. Максимальный защитный эффект от летального заражения возбудителем антракса овец наблюдался через 15 дней после иммунизации испытываемым вакцинным штаммом – из 10 зараженных после иммунизации выжили все использованные в опыте животные. Выживаемость овец в 1-й группе к этому сроку составляла 70 %, что уступает испытываемому варианту вакцины в 1,43 раза ($P < 0,05$).

Таблица – Иммуногенные и антигенные свойства вакцин из штаммов 55 и 55 R у овец

Вакцинный штамм	Заражающий штамм	Иммунизирующая доза, м.к.	Выживаемость животных, зараженных вирулентным штаммом <i>B. anthracis</i> «Ч-7» после заражения (дни), %			Титры антител, \log_2 после иммунизации, через (дни)					
			3	7	15	РНГА			ИФА		
						3	7	15	3	7	15
№ 55	«Ч-7»	1x10 ⁹	10	30	70	0,5±0,1	1,7±0,3	2,5±0,7	1,3±0,5	3,3±0,9	6,7±1,2
№ 55 R	«Ч-7»	1x10 ⁹	80	90	100	3,3±0,5	4,1±0,7	6,6±1,9	4,7±1,1	6,9±1,3	9,9±2,1
Конт-роль	«Ч-7»	-	0	0	0	-	-	-	-	-	-

Примечание: х – $P < 0,05$

Результаты изучения синтеза протективных антител, в зависимости от срока иммунизации и от вида использованной вакцины, показали, что выживаемость животных коррелировала с уровнем синтеза протективных (антитоксических) антител. Так, если титр гемагглютининов у иммунизированных вакциной из штамма 55 животных на 3 сут. составлял 0,5±0,1 \log_2 , то у иммунизированных испытываемой радиовакциной из штамма 55 R он составлял 3,3±0,5 \log_2 , что обеспечивало выживаемость 80% зараженных возбудителем антракса животных. С увеличением интервала между иммунизацией и заражением наблюдалась тенденция нарастания титра гемагглютининов, и к 15 сут. количество их составляло 6,6±1,5 \log_2 против 2,5±0,7 \log_2 в 1-й группе ($P < 0,05$). Указанный уровень протективных антител обеспечивал защиту 100 % зараженных животных возбудителем сибирской язвы животных при 70 % защите после применения известной вакцины из штамма 55.

Результаты параллельных иммунохимических исследований с использованием ИФА-теста подтвердили результаты серологических исследований (РНГА-тест).

Формирование экстренного защитного эффекта на фоне применения радиоинaktivированной сибирезавенной вакцины объясняется тем, что, во-первых, убитые микробы беспрепятственно обходят систему иммуногенетического контроля, достигая значительно раньше клеток-мишеней системы иммунитета, чем живые клетки; во-вторых, наличие в составе вакцины протективного антигена ускоряет синтез специфических антител; в-третьих, убитые клетки усиливают синтез цитокинов, обеспечивающих экстренную защиту организма от патогенного агента и, в-четвертых, убитые клетки вакцинного штамма формируют эффект интерференции, осуществляя конкуренцию к патогенному агенту, занимая клетки-мишени поражения и усиливая функцию фагоцитов – основных эффекторных клеток в борьбе с возбудителем антракса.

Выводы. Путем облучения исходного штамма *B. anthracis* 55 γ -лучами ^{60}Co в дозе 20 кГр получен радиоинaktivированный вариант вакцины *B. Anthracis* 55 R.

Использование полученной вакцины обеспечивает создание экстренной 80–100 %-ной защиты животных от экспериментального заражения возбудителем сибирской язвы в течение 3–15 сут. после вакцинации.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с использованием эритроцитов, сенсibilизированных протективным антигеном (анатоксином) и иммуноферментный анализ (ИФА) с энзим-меченым антигеном характеризуют видовые и типовые качества сибирезавенных вакцин и согласуются с иммуногенными свойствами препарата. Вопрос о применении этих реакций в качестве тестов оценки антигенности и иммуногенности сибирезавенных вакцин может быть окончательно решен после проведения широкомасштабных производственных испытаний на различных видах сельскохозяйственных животных.

Список литературы

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (Антракс). Новые страницы в изучении «старой болезни» [Текст] / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир, 2001. – 284 с.
2. Иванов, А.В. Радиовакцины: проблемы и перспективы [Текст] / А.В. Иванов, Р.Н. Низамов, Г.В. Конохов. – Казань : Изд-во Казанского гос. ун-та, 2008. – 499 с.
3. Ипатенко, Н.Г. Сибирская язва [Текст] / Н.Г. Ипатенко. – 2-ое изд. – М. : Колос, 1996. – 335 с.
4. Мальберг, К. Реакция пассивной гемагглютинации [Текст] / К. Мальберг // Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
5. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики [Текст] / Г.Г. Онищенко [и др.]. – М. : ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 432 с.
6. Фримель, Х. Иммуноферментный анализ [Текст] / Х. Фримель, Г. Хольцхайдт // Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М. : Медицина, 1987. – С. 171–175.

DETERMINATION OF ANTIGENIC AND IMMUNOGENIC ACTIVITY OF A ANTHRAX RADIO-VACCINE

Ivanov A.V., Pankov Ya.G., Pankova E.V.

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan

By radiation of a vaccinal strain *B. anthracis* 55 using γ - ray ^{60}Co at a dose 20 kGy the radio inactivated version of a vaccinal strain of *B. anthracis* 55 R was obtained. It is established that immunization of animals by the indicated vaccine provides emergency 80–100 % protection of animals against experimental anthrax within 3–15 days after immunization. Results of indirect hemagglutination test and ELISA on the basis of sensibilized a protective antigen of erythrocytes and enzyme marked protective antigen correlate with survival of the infected animals and titers of blood serum protective antibodies at 3,3–6,6 \log_2 in IHT and 4,7–9,9 \log_2 in ELISA provide 80–100 % protection of animals from experimental anthrax.

УДК 616.24-001:612.017.1.312

СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ ХІМІОРЕЗИСТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Ковальова Г.О.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»,
КЗОЗ Обласний протитуберкульозний диспансер № 1, м. Харків

Питання чутливості та резистентності до хіміопрепаратів завжди супроводжує будь-яке інфекційне захворювання. Відомо, що медикаментозна резистентність з'являється внаслідок генетичних мутацій, що відбуваються з частотою 10^{-7} – 10^{-10} на одне поділення бактеріальної клітини, що призводить до появи в бактеріальній популяції одного резистентного мікроба на 10^6 – 10^8 чутливих мікроорганізмів. За даними спеціальних досліджень, якщо генетична мутація відбувається за відсутності антибіотику, до якого вона виникла, то цей штам мікроорганізму не відіграє ніякої ролі в решті мікробної популяції, чутливої до ліків. При застосуванні антибіотиків відбувається селекція саме резистентних штамів, особливо при поширених деструктивних процесах, з дуже великою кількістю мікроорганізмів. За неефективного лікування мікроорганізми продовжують розмножуватись з появою нових резистентних мутантів. При туберкульозі (ТБ) резистентність мікобактерії туберкульозу (МБТ) до антибактеріальних препаратів є особливо несприятливим явищем через обмежену кількість існуючих протитуберкульозних препаратів (ПТП). За даними спеціальної літератури, у хворих, які раніше отримували протитуберкульозну терапію, імовірність наявності хіміорезистентності в 4 рази вище, а розширеної медикаментозної резистентності МБТ – в 10 разів вище, ніж у пацієнтів, які отримують лікування вперше. При хіміорезистентному туберкульозі (ХРТБ) відбувається накопичення мутацій, що закріплюються у 2–3 генах, до окремих препаратів при тривалому розмноженні бактерій. Швидкість поширення мультирезистентного туберкульозу (МРТБ) обумовлена високою репродуктивною здатністю хіміорезистентних штамів МБТ, особливо тих, які належать до Пекінської родини. В'єтнам і Естонія вже доповіли про поширеність такого штаму МБТ на їх територіях [1, 2].

Отже, поява ХРТБ пов'язана з втручанням людини та тварин, що відбувається спонтанно в процесі розмноження МБТ.

Дані щодо розповсюдженості резистентних штамів МБТ в різних регіонах України значно відрізняються. Епідеміологія резистентних штамів МБТ вивчена недостатньо та потребує всебічного дослідження.

Мета роботи. Визначення структури та профілю медикаментозної резистентності мікобактерій до I ряду ПТП (ізоніазиду (H), рифампіцину (R), стрептоміцину (S), етамбутолу (E)).

Матеріали та методи досліджень. Проведено ретроспективний аналіз результатів тесту медикаментозної чутливості (ТМЧ) мікобактерій до ПТП за результатами культуральних досліджень штамів, виділених від хворих бактеріовиділювачів, які перебували на лікуванні у протитуберкульозних стаціонарах Харківської області в 2006–2012 роках. Проведено аналіз звітів бактеріологічних лабораторій, які мали дозвіл на проведення ТМЧ, та обліково-статистичних форм.

Результати досліджень та їх обговорення. Частоту виявлення МБТ та перерозподіл їх щодо чутливих та стійких проаналізовано за період від початку впровадження DOTS в медичну практику до нині. У Харківській області частота виявлення медикаментозно чутливих штамів становила близько половини і мала тенденцію до достовірного зростання (з 46,3 % у 2006 р. до 58,5 % у 2012 р.) та становила в середньому за роки спостереження 59,2 %. Відсоток медикаментозно резистентних штамів серед бактеріовиділювачів, у середньому за період спостереження, становив близько 42,3 %. Таке явище на перший погляд дещо суперечить загальносвітовим тенденціям перебігу епідемії туберкульозу та природнім законам розвитку резистентності. Однак це можна пояснити впровадженням контрольованого лікування з дотриманням пацієнтами режимів та схем застосування ПТП. Тобто, отримані дані підтверджують відсутність поширення резистентності при раціональному застосуванні ПТП.

У структурі медикаментозної резистентності МБТ в роки спостереження переважали мультирезистентні штами (63,7 %), монорезистентні штами становили найменшу частку (18,8 %). Частота виявлення полірезистентних штамів складала 17,5 %. Зростання мультирезистентних штамів вказує на несприятливий перерозподіл в структурі резистентності.

Досліджено профіль моно-, мульти- та полірезистентності мікобактерій. У профілі монорезистентності найменшою серед кількості стійких штамів МБТ до ПТП I ряду виявилась частота етамбутол- та рифампіцинрезистентних штамів і була достовірно низькою (11,6 % і 15,4 % відповідно). Найчастіше в профілі монорезистентності зустрічалися стрептоміцинрезистентні штами – 47,38 %. Питома вага монорезистентних штамів була найбільшою у вперше діагностованих бактеріовиділювачів (57,7 %). Зменшення монорезистентності серед інших категорій хворих пояснюється збільшенням полірезистентних штамів.

Визначено частоту та профіль мультирезистентності та рівні співвідношення мультирезистентного штаму HR з комбінаціями препаратів I ряду. Так, резистентність до комбінації препаратів HR виявлялась в середньому у 8,16 % серед всіх мультирезистентних, хоча спостерігались різкі коливання частоти виявлення у 2006 та 2007 роках (17,2 % та 4,3 %), на наш погляд, за рахунок неповного охопту постановки ТМЧ. Стієкість вилучених ізолятів до комбінації препаратів HRE виявилась найнижчою (3,1 %). Резистентність штамів до комбінації препаратів HRS зустрічалася в середньому у 24,1 % і мала виражені коливання цього показника у 2007 р. порівняно з іншими роками (13,9 %). У той же час, 23,9 % складала резистентність до комбінації HR з іншими препаратами. Заслужують на увагу показники частоти виявлення в структурі мультирезистентності штамів до комбінації препаратів HRES, які разом складають майже половину (46,1 %) в структурі мультирезистентності, причому різке зростання частоти їх виявлення кон-