

BASIS FOR IMPLEMENTATION OF REFERENCE-DRUG FOR ANTHRAX SPORE VACCINE

Ushkalov V.A., Machuskyy O.V., Babkin M.V., Vygovska L.M., Kovtun V.A.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains, Kyiv

Koshelnyk V.G.

Kherson State Undertaking Biological Factory, Kherson

Krinichnyy O.M.

Department of Veterinary Medicine in Kherson, Kherson

In this study, were shown need of implementation of reference-drug of anthrax spore vaccine and the immunogenic properties of the "Anthrax vaccine strain of animals from Sterne 34F2" compared with other vaccines. Determine the stability of drugs, residual virulence and immunogenicity ImD_{50} designed to study drug.

Found that ImD_{50} "Vaccine against anthrax animals from strain Sterne 34F2" has the lowest among the tested drugs, which will reduce the amount of antigen component (viable spores) in this vaccine to 12 ± 4 spores per ml. This reduces the load on the immune system of animals, which facilitates the formation of stable and intense antianthrax immunity.

УДК 619:616.98:579.873.21:636.2

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ *M. BOVIS* BCG-1, *M. BOVIS*-8 И *M. BOVIS* VALLEE
ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫХ И ПОСТИНФЕКЦИОННЫХ АНТИТЕЛ

Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Ахмадеев Р.М.

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

Найманов А.Х.

ГНУ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко, г. Москва, Российская Федерация

Туберкулез распространен во многих странах мира и продолжает оставаться важной проблемой ветеринарии и медицины [4]. Микобактерии бычьего вида, *Mycobacterium bovis*, вызывают заболевание у крупного рогатого скота, барсуков, коз, овец, оленей, верблюдов, кошек, собак, лисиц, свиней и многих других животных, а также у человека. Своевременная диагностика и изолирование больных животных являются главными элементами борьбы с этим заболеванием. Внутрикожная туберкулиновая проба является основным методом в диагностике и контроле туберкулеза крупного рогатого скота. Однако она обладает недостаточной чувствительностью и специфичностью [3]. Перспективным в этом направлении являются методы иммуноферментного и иммуноблот анализов, в том числе и мультиплексные их варианты [1, 5, 6]. Вместе с тем, актуальной проблемой остается дифференциация инфицированного от вакцинированного поголовья крупного рогатого скота.

Целью работы явилось получение антигенов микобактерий *M. bovis* BCG -1, *M. bovis*-8, *M. Bovis* Vallee-88 и изучение возможности их использования в иммуноферментном анализе для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител к возбудителю туберкулеза крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили с микобактериями: *M. bovis*-8, *M. avium*, *M. intracellulare*, полученных из коллекции лаборатории микобактериозов ГНУ ВИЭВ им. Я.П. Коваленко, *M. tuberculosis* – из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва), производственным *M. bovis* Vallee-88 – из лаборатории «Музей штаммов» ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», а также вакциной туберкулезной из штамма BCG-1 – из ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. В работе использовали сыворотки крови кроликов, иммунизированных антигенами вышеуказанных микобактерий.

Фракционирование белков, содержащихся в фильтрате культурального супернатанта, проводили в ступенчатом градиенте плотности сахарозы на ультрацентрифуге «Beckman», ротор Ti.

Уровень антител к исследуемым антигенам определяли стандартным методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антивицевого конъюгата использовали антитела диагностические против IgG кролика или быка, НИИЭИМ им. Н.Ф. Гамалеи. Учет реакции проводили спектрофотометрически при 490 нм. Диск-электрофорез выполняли в пластинчатом 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) по U.K. Laemmli [8]. Для окрашивания белков, фракционированных в ПААГ, использовали 0,04 % кумасси ярко синий G-250 в 3,5 % растворе хлорной кислоты. В случае недостаточной плотности окрашенных зон, проводили дополнительное окрашивание с помощью $AgNO_3$. Определение молекулярных масс антигенов выполняли электрофоретическим методом по ранее описанной методике [2], используя набор белков «SDS-PAGE Standards Broad Range» (Bio-Rad). Электроперенос белков, фракционированных в ПААГ, на нитроцеллюлозную мембрану проводили на аппарате «TRANS-BLOON SD» (Bio-Rad).

Результаты исследований. По данным некоторых исследователей [10] наиболее значимыми в серологических реакциях являются белки микобактерий с молекулярной массой (м.м.) 88 кДа, 45–47 кДа, 38 кДа, 29–31 кДа, 16 кДа, 14 кДа и 6,5 кДа. В связи с этим было изучено наличие содержания указанных белков в клетках различных видов микобактерий (Рис. 1).

Анализ электрофореграмм полных клеточных лизатов ряда микобактерий, некоторые из которых являются этиологическими агентами туберкулеза, показал значительные различия в количественном и качественном содержании белков. Так, у *M. tuberculosis* их четыре: с м.м. 120 кДа, 90 кДа, 55 кДа и 45 кДа, тогда как *M. bovis*-8 имеет одну мажорную фракцию с м.м. 55 кДа, а *M. intracellulare* и *M. avium* – по одной мажорной фракции – с м.м. 45 кДа. В отличие от спектров белков других видов микобактерий вакцина BCG имеет значительно большее количество низкомолекулярных белков и малое количество белка с м.м. 45 кДа.

По данным некоторых исследователей [2, 7, 9], указывается на диагностическую ценность антигена с м.м. 45 кДа. В связи с этим, в дальнейших исследованиях проводили наработку антигенов микобактерий с м.м. 45 кДа.

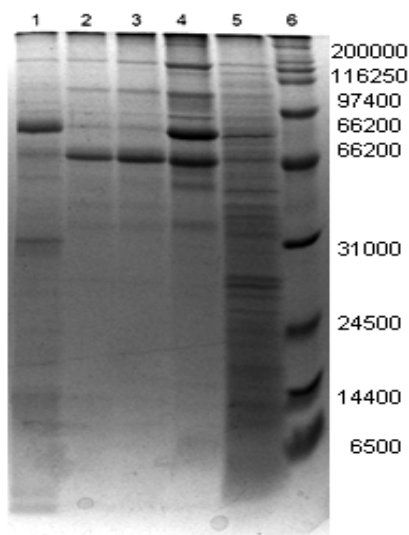


Рис. 1. Электрофорез микобактерий, культивированных на среде Левенштейна-Йенсена (окрашивание кумасси ярко синим G-250).
Примечание: 1. *M. bovis*-8; 2. *M. intracellulare*; 3. *M. avium*; 4. *M. tuberculosis*; 5. *M. bovis* BCG-1; 6. Маркеры молекулярной массы (Bio-Rad), в дальтонах.

Клетки *M. bovis* различных штаммов, выращенные в среде Сотона, осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 8000 об/мин и трижды отмывали физиологическим раствором, pH 7,4, с последующим центрифугированием. Бактериальные клетки суспендировали в равном объеме 10 % водного раствора диметилсульфоксида (ДМСО) и в течение 30 мин гомогенизировали. Гомогенат подвергали диализу против дистиллированной воды, а затем – против 0,05 М трис-HCl буфера, pH 7,4–7,6. Клетки микобактерий осаждали центрифугированием, полученный ДМСО – экстракт служил исходным материалом для получения антигенного препарата с молекулярной массой 45 кДа. От балластного материала освобождались, варьируя значениями pH антигенсодержащего раствора, применяя методы высаливания и осаждения органическими растворителями, а также метод гель-фильтрации на сефадексе G-200. Контроль очистки проводили, используя метод электрофореза (Рис. 2).

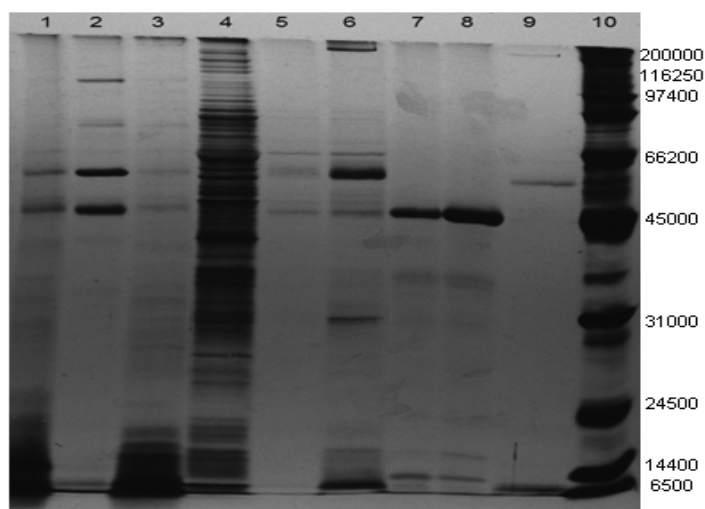


Рис. 2. Электрофорез антигенов микобактерий (окрашивание азотнокислым серебром)

Примечание: 1. *M. tuberculosis* твердофазное культивирование (клетки). 2. *M. tuberculosis* твердофазное культивирование (антиген). 3. *M. bovis* BCG твердофазное культивирование (клетки). 4. *M. bovis* BCG-1 сухая биомасса, ФГУП НПО «Микроген». 5. *M. bovis* BCG-1 жидкофазное культивирование (клетки). 6. *M. bovis*-8 жидкофазное культивирование (клетки). 7. *M. bovis* BCG-1 концентрированный супернатант жидкофазного культивирования. 8. *M. bovis*-8 концентрированный супернатант жидкофазного культивирования. 9. *M. bovis*-8 твердофазное культивирование. 10. Маркер молекулярных масс 6,5–200 кДа «SDS-PAGE Standards Broad Range» (Bio-Rad).

В результате исследований был получен антигенный препарат, содержащий одну серопозитивную фракцию с м.м. в 45 кДа. Установлена специфичность полученных микобактериальных антигенов методом ИФА. Результаты представлены в таблице.

Таблиця – Результати спектрофотометричного учета ИФА сывороток крови кроликов, иммунизированных различными микобактериями

Сыворотки кроликов, иммунизированных различными микобактериями	Титры антител, K_{cn}		
	Антигены микобактерий, используемые для сенсибилизации планшета		
	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> -8	<i>M. bovis</i> Vallee
<i>M. bovis</i> BCG	отриц.	1:1600, $K_{cn}=2,3$	1:3200, $K_{cn}=2,3$
<i>M. bovis</i> -8	1:3200, $K_{cn}=2,4$	1:3200, $K_{cn}=3,2$	1:3200, $K_{cn}=3,0$
<i>M. bovis</i> Vallee	1:1600, $K_{cn}=2,1$	1:3200, $K_{cn}=3,9$	1:3200, $K_{cn}=4,0$
<i>M. tuberculosis</i>	1:200, $K_{cn}=2,2$	1:3200, $K_{cn}=3,4$	1:3200, $K_{cn}=3,1$
<i>M. intracellulare</i>	1:3200, $K_{cn}=2,5$	1:3200, $K_{cn}=3,6$	1:3200, $K_{cn}=3,2$
<i>M. avium</i>	1:400, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$	1:800, $K_{cn}=2,5$

Из данных таблицы следует, что полученные антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee позволяют проводить дифференциацию поствакцинальных и постинфекционных антител.

Выводы. 1. Получены антигены микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Vallee и установлена возможность их использования для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител к возбудителю туберкулеза крупного рогатого скота.

2. Установлена специфичность полученных микобактериальных антигенов методом иммуноферментного анализа.

Список литературы

- Агеева, Т.Н. Корреляционная зависимость выявления в крови иммунных комплексов и микобактериальных антигенов с помощью ИФА и результатов бактериологической диагностики туберкулеза на среде ВКГ [Текст] / Т.Н. Агеева, А.П. Лысенко, Е.М. Красникова // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария. – 2005. – № 2. – С. 39–42.
- Альфредо, Э. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* [Текст] / Э. Альфредо, В.И. Вершинина, К.С. Хаертынов // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 1. – С. 18–22.
- Верховский, О.А. Диагностическое значение реакций клеточного иммунитета при туберкулезе крупного рогатого скота [Текст] / О.А. Верховский, А.Х. Найманов, О.А. Савицкая // Актуальные пробл. инфекц. патологии и иммунологии животных; [ВНИИЭВ]. – М., 2006. – С. 180–184.
- Овдиенко, Н.П. Туберкулез как международная и национальная медико-ветеринарная проблема в современных условиях [Текст] / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко // Вет. врач. – 2009. – № 2. – С. 14–17.
- Шуралев, Э.А. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] / Э.А. Шуралев, Э.В. Ндаишимийе, М.Н. Мукминов // Уч. зап. КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 211. – С. 202–206.
- Якупов, Т.Р. Иммуноблот анализ в диагностике туберкулеза [Текст] / Т.Р. Якупов, К.С. Хаертынов // Вет. врач. – 2011. – № 1. – С. 29–31.
- Immunoblot analysis for serodiagnosis of tuberculosis using a 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / S. Diagbouga [et al.] // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1997. – Vol. 4, № 3. – P. 334–338.
- Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 [Text] / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Roman, F. Deglycosylation of the 45/47 kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit *in vivo* or *in vitro* cellular immune responses [Text] / F. Roman, C. Horn, P. Pescher // Inf. Immun. – 1999. – Vol. 67, № 11. – P. 5567–5572.
- Wang, B.L. Antibody response to four secretory proteins from *Mycobacterium tuberculosis* and their complex antigen in TB patients [Text] / B.L. Wang, Y. Xu, Z.M. Li // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2005. – Vol. 9, № 12. – P. 1327–1334.

PREPARATION OF MYCOBACTERIAL ANTIGENS OF *M. BOVIS* BCG-1, *M. BOVIS*-8 AND *M. BOVIS* VALLEE FOR DIFFERENTIATION OF POST-VACCINATION AND POSTINFECTIOUS ANTIBODIES

Khismatullina N.A., Khaertynov K.S., Shuralev E.A., Gulyukin A.M., Akhmadeev R.M.,

Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

Naimanov A.Kh.

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, Russia

*A new method of *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8, *M. bovis* Vallee antigens preparation is developed. The antigens allow differentiating postinfectious and post-vaccination antibodies to bovine tuberculosis pathogen. The specificity of mycobacterial antigens in ELISA is established.*

УДК 619:578:616.98:578.828.11

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕНПРОДУКУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН FLK-BLV ПІД ВПЛИВОМ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ

Шаповалова О.В., Горбатенко С.К., Кузнецова О.В., М'яких Н.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Підвищення виходу вірусу лейкозу ВРХ та його антигенів, які продукуються у перещеплюваних культурах клітин, є насувною потребою виробництва. Як відомо, одним з механізмів, що впливають на експресію інтегрованих вірусів, є оксидативний стрес [1]. А. Bondzio та співавтори показали, що у відповідь на короткострокову інкубацію з перекисом водню у низькій концентрації в хронічно інфікованих ВЛВРХ культурах клітин FLK-BLV 44-1 та BL 3.1 активується експресія вірусу лейкозу [2]. Крім того, експериментальними дослідженнями на культурі клітин було доведено, що транскрипційна відповідь BLV на інгібітор деацитилаз гістонів опосередковується активними формами кисню [3].

Виходячи з вказаного вище, метою нашої роботи було випробування активних форм кисню в якості стимулятора продукції антигену ВЛВРХ в перещеплюваній культурі клітин нирки ембріона вівці, хронічно інфікованих вірусом лейкозу великої рогатої худоби (FLK-BLV).

Матеріали та методи. Клітини FLK-BLV вирощували за загальноживинними методиками. Засів клітин проводили у стерильні флакони об'ємом 50–500 см³; бактеріологічні пробірки з покривними скельцями з концентрацією 100–300 × 10³ клітин/см³ поживного середовища. Експеримент проводили з використанням двох варіантів поживного середовища. Поживне середовище № 1 складалось з 45 % середовища Ігла, 45 %