

Т.А.Севских, Ю.О.Селянинов, И.Ю.Егорова

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ВАКЦИННОГО ШТАММА 55-ВНИИВВиМ И БЕСКАПСУЛЬНОГО ШТАММА *BACILLUS ANTHRACIS* 363/11

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии»
Россельхозакадемии, Владимирская обл., п. Вольгинский, Российская Федерация

Основной целью работы было определение протективных свойств и безопасности для животных естественно аттенуированного бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 и оценка возможности его использования в качестве кандидатного для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской язвы. Для сравнительного изучения протективных свойств использовали вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ, применяемый для обеспечения благополучия по сибирской язве животных на территории России. С использованием стандартизированных методов на модели лабораторных (белые мыши, морские свинки) и целевых животных (овцы) определяли показатели ЛД₅₀, ИмД₅₀ и протективную эффективность. Установлено, что авирулентный для белых мышей штамм *B. anthracis* 363/11 обладает иммуногенной и протективной эффективностью, превышающими таковые для штамма 55-ВНИИВВиМ. Штамм стабилен и не реверсирует к вирулентному варианту при пассировании на питательных средах и через организм восприимчивых животных. Это дает основание для того, чтобы рассматривать штамм *B. anthracis* 363/11 в качестве кандидатного вакцинного, применение которого будет способствовать улучшению эпизоотической ситуации по сибирской язве в РФ.

Ключевые слова: сибирская язва, иммуногенная активность, протективность, кандидатная вакцина.

Корреспондирующий автор: Севских Тимофей Александрович, e-mail: sefskih@mail.ru.

T.A.Sevskikh, Yu.O.Selyaninov, I.Yu.Egorova

Protective Properties of the Vaccine Strain 55-VNIIVViM and Acapsular Strain *Bacillus anthracis* 363/11

National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Science, Vladimir region, Volginsky, Russian Federation

Objective of the work was to determine protective potential and safety for animals of the naturally attenuated *B. anthracis* 363/11 monoplasmid non-capsular strain to be used as a new candidate vaccine strain for the development and enhancement of specific prophylaxis of anthrax. **Materials and methods.** Vaccine strain 55-VNIIVViM that is used for welfare provision as regards anthrax in animals in the territory of Russia was employed for the comparison of protective properties. Identification of LD₅₀, ImD₅₀ and protective efficacy was carried out using standard protocols for modeling the infection on laboratory (white mice, guinea pigs) and targeted (sheep) animals. **Results and conclusions.** It is established that avirulent for white mice *B. anthracis* 363/11 strain demonstrates higher protective and immunogenic activity than 55-VNIIVViM strain. It does not reverse to the virulent variant after passaging on the nutrient media and in the organism of susceptible animals. Thus it allows for considering *B. anthracis* 363/11 strain as a promising candidate vaccine strain, the utilization of which will improve epizootic situation on anthrax in the Russian Federation.

Key words: *B. anthracis*, immunogenic activity, protectivity, candidate vaccine.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The study is financially supported by the Federal Agency for Scientific Organizations within the frames of the research project under the No 0615-2016-0001.

Corresponding author: Timofei A. Sevskikh, e-mail: sefskih@mail.ru.

Citation: Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. Protective Properties of the Vaccine Strain 55-VNIIVViM and Acapsular Strain *Bacillus anthracis* 363/11. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:84–86. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-84-86

Основным требованием, предъявляемым к сибирезвенным вакцинным штаммам, является обеспечение ими 80–100 % уровня защиты привитых лабораторных животных против заражения референтными вирулентными культурами сибирезвенового микроба [4]. Вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и 55-ВНИИВВиМ, используемые для вакцинации в медицинской и ветеринарной практике, соответствуют данным требованиям. Однако, согласно литературным и экспериментальным данным, отдельные штаммы, выделяемые из почвы скотомогильников или во время вспышек болезни у человека и животных [2], а также рекомбинантные штаммы, приобретшие новые свойства в результате генетиче-

ских манипуляций, обладают способностью преодолевать иммунитет, индуцированный этими вакцинами [3] и, соответственно, снижать эффективность противосибирезвенных мероприятий. Для повышения защитных свойств сибирезвенных вакцин и формирования ими более выраженного иммунного ответа необходимо, чтобы в составе новых вакцинных препаратов был наиболее полно представлен спектр антигенов, антитела к которым принимают участие в формировании напряженного иммунитета против изолятов, способных преодолевать иммунитет. Решить эту проблему можно несколькими путями: созданием рекомбинантных штаммов и штаммов-продуцентов антигенов с использованием

генно-инженерных технологий, конструированием бивалентных вакцин, аттенуацией вирулентных штаммов, способных преодолевать иммунитет, с сохранением их антигенных особенностей и поиском новых кандидатных штаммов, отличающихся от известных набором фенотипических свойств и продуцируемых антигенов. В связи с изложенным нами было проведено сравнительное изучение протективных свойств нового бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 и известного вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ с целью определения возможности использования первого из них в качестве кандидата для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской язвы.

В работе использовали споровые культуры вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11, выделенного от павшего подсвинка. Сравнительную оценку протективных свойств и напряженности индуцируемого иммунитета изучали в экспериментах на морских свинках и овцах с использованием капсулообразующих референс-заражающих штаммов (II вакцина Ценковского – *B. anthracis* 71/12, II вакцина Пастера – *B. anthracis* 17JB, вирулентный штамм *B. anthracis* 76), капсулообразующего вакцинного штамма (Carbovax) и полевых изолятов (*B. anthracis* 81, 304, 364), выделенных в Казахской АССР, Алтайском крае и Тульской области в 1974, 1989 и 2011 гг. соответственно. Изменение показателя ЛД₅₀ в процессе пассирования штамма *B. anthracis* 363/11 *in vitro* изучали в опытах на белых аутбредных мышах. Все штаммы/изоляты получены из Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии.

Иммуногенную активность штаммов оценивали на клинически здоровых морских свинках массой 350–400 г количественным методом (ИД₅₀). Из споровых суспензий штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 готовили разведения с содержанием 10⁷, 2·10⁶, 4·10⁵, 8·10⁴, 1,6·10⁴ живых спор в 0,5 см³. Материал каждого из разведений инокулировали подкожно в область живота в объеме 0,5 см³ 7–8 особям. Через 21 сут после иммунизации по 6 голов животных из каждой группы и 6 интактных морских свинок заражали культурами сибиреязвенных штаммов в дозе 200 ЛД₅₀. Расчет показателей ИД₅₀ проводили в соответствии с ГОСТ Р 52616-2006 «Вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ живая».

Протективную эффективность штаммов изучали на клинически здоровых морских свинках массой 300–400 г. Животных 7 групп по 12 голов в каждой иммунизировали споровой суспензией вакцинного штамма *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и аналогичное количество морских свинок – испытуемого штамма *B. anthracis* 363/11 в дозе 10⁷ спор. Через 21 сут после иммунизации животных различных групп (по 10 голов в каждой) заражали капсулообразующими вакцинными штаммами и полевыми изолятами в дозе

200 ЛД₅₀. Наблюдение за животными и учет их гибели проводили в течение 10 дней после заражения.

Показатель вирулентности (ЛД₅₀) для культур исследуемого штамма определяли на белых аутбредных мышах массой 18–20 г. Из мышей формировали 5 групп по 6 голов в каждой. Животным опытных групп подкожно вводили по 0,5 см³ споровых суспензий штамма с концентрациями 2·10⁸, 4·10⁷, 8·10⁶, 1,6·10⁶, 3,2·10⁵ спор в 1 мл. Наблюдение за мышами и учет их гибели проводили в течение 10 дней. Величину ЛД₅₀ рассчитывали по формуле Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А. Воробьева.

Работу с животными проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1987).

Ранее при проведении работ по паспортизации сибиреязвенных штаммов было установлено, что культура бескапсульного штамма *B. anthracis* 363/11 обладает высокой иммуногенностью, низкой реактогенностью и отличается по фенотипическим признакам от отечественных вакцинных штаммов (обладает высокой протеолитической и гемолитической активностями, поглощает конго красного из среды, синтезирует протокатеховую кислоту) [1], что и обусловило выбор объекта исследований.

При последующем проведении сравнительного изучения на морских свинках иммуногенной активности штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 установлено, что значение ИД₅₀ для штамма 55-ВНИИВВиМ против заражения споровыми культурами капсулообразующих штаммов *B. anthracis* 71/12 и Carbovax в дозе 200 ЛД₅₀ составило 2,9·10⁵ и 3,4·10⁵ спор, в то время как аналогичные показатели ИД₅₀ для штамма *B. anthracis* 363/11 были значительно ниже и составили 2,95·10⁴ и 1,55·10⁵ спор соответственно.

На следующем этапе изучен спектр протективной эффективности штаммов *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ и 363/11 в экспериментах на различных биологических моделях (морские свинки и овцы) с использованием как культур референс-заражающих штаммов, так и полевых изолятов. Установлено, что введение морским свинкам суспензий спор вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и кандидатного штамма 363/11 в дозе 10⁷ спор предохраняло от гибели 80–100 % животных, зараженных споровыми культурами капсулообразующих штаммов *B. anthracis* 71/12, 76, 17JB и Carbovax в дозе 200 ЛД₅₀. Однако в экспериментах с использованием в качестве заражающих культур вирулентных полевых изолятов *B. anthracis* была выявлена существенная разница в уровнях протективной эффективности исследуемых штаммов. Иммунизация животных штаммом *B. anthracis* 363/11 защищала 100, 50 и 40 % морских свинок от заражения штаммами *B. anthracis* 81, 304, 364 соответственно, но при этом процент защиты животных, вакцинированных штаммом *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, для указанных полевых изолятов

составил 40, 25 и 10 % соответственно.

Различие в протективной эффективности штаммов было подтверждено и в опытах на овцах в возрасте 1–1,5 года, ранее не привитых против сибирской язвы. Введение овцам споровых суспензий штамма *B. anthracis* 363/11 в дозе $12,5 \cdot 10^6$ спор защищало животных от заражения высоковирулентными полевыми штаммами *B. anthracis* 76, 81 и 364 не менее чем в 10 безусловно смертельных дозах для этого вида животных. Вакцинация овец штаммом 55-ВНИИВВиМ защитила от гибели только животных, зараженных штаммом *B. anthracis* 76. В остальных группах животные заболели и пали на 3–5-е сутки с симптомами острой формы сибирской язвы.

Оценку стабильности сохранения штаммом *B. anthracis* 363/11 биологических, протективных свойств и вероятности реверсии проводили с использованием метода последовательных пассажей на питательных средах. Установлено, что после 3-го пассажа у культуры начинает снижаться ферментативная активность, остаточная вирулентность и иммуногенность. Так, к 7-му пассажу вирулентность штамма для белых аутбредных мышей снизилась в 23 раза – показатель ЛД₅₀ возрос с $3,16 \cdot 10^5$ до $7,28 \cdot 10^6$ спор. Иммуногенная активность против штаммов *B. anthracis* 71/12 и Carbovax также снизилась более чем в 30 раз – показатели ИД₅₀ возросли с $2,9 \cdot 10^4$ до $1,0 \cdot 10^6$ спор и с $1,55 \cdot 10^5$ до $8,4 \cdot 10^6$ спор соответственно. Полученные результаты свидетельствуют не только о безопасности кандидатного штамма, но и о необходимости проведения дальнейших исследований по оптимизации системы его культивирования и поддержания в активном состоянии.

Таким образом, в результате исследований, направленных на поиск новых сибирезавенных штаммов, обладающих более широким спектром защитного действия, чем применяемые в настоящее время, и пригодных для разработки эффективных средств специфической профилактики, установлено, что природный естественно аттенуированный моноплазмидный бескапсульный штамм *B. anthracis* 363/11, выделенный от павшего подсвинка, обладает протективными свойствами, позволяющими отнести его к кандидатным для разработки и совершенствования средств специфической профилактики сибирской

язвы. Данные экспериментов с использованием биологических моделей свидетельствуют о его высоких иммуногенных свойствах, превышающих таковые вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, и его перспективности в качестве кандидата для разработки вакцины для нужд ветеринарии.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО в рамках выполнения научной темы № 0615-2016-0001.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егорова И.Ю., Севских Т.А., Селянинов Ю.О. Иммунобиологические свойства нового бескапсульного штамма *Bacillus anthracis* 363/11. *Биотехнология*. 2015; 5:34–41.
2. Ипатенко Н.Г., Гаврилов В.А., Маничев А.А., Бастаров С.И., Саленко Л.С., Яковлева Т.Н., Степанова В.В., Шморгун Б.И., Киселев Ю.Т., Сайиткулов Б.С. Опыт профилактики сибирской язвы у сельскохозяйственных животных в России. *Ветеринария*. 1995; 5:27–30.
3. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Степанов А.В., Старицын Н.А., Померанцев А.П., Алешкин В.А. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 224 с.
4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. 2012. Vol. 1, Chapter 2.1.1. Anthrax. P. 87–97.

References

1. Egorova I.Yu., Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O. [Immunobiological properties of a new non-capsular *Bacillus anthracis* 363/11 strain]. *Biotechnologiya*. 2015; 5:34–41.
2. Ipatenko N.G., Gavrilov V.A., Manichev A.A., Bastarov S.I., Salenko L.S., Yakovleva T.N., Stepanova V.V., Shmorgun B.I., Kiselev Yu.T., Sayitkulov B.S. [Experience in prophylaxis of anthrax in livestock animals in Russia]. *Veterinariya*. 1995; 5:27–30.
3. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Stepanov A.V., Staritsyn N.A., Pomerantsev A.P., Aleshkin V.A. [Microbiological Diagnostics of Anthrax]. М.; 1999. 224 p.
4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7th Edition. 2012. Vol. 1, Chapter 2.1.1. Anthrax. P. 87–97.

Authors:

Sevskikh T.A., Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu. National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Science, 1, Akademika Bakulova St., Settlement Volginsky, Vladimir Region, 601125, Russian Federation. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

Об авторах:

Севских Т.А., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю. Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии. Российская Федерация, 601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1. E-mail: VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru.

Поступила 29.12.16.