



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРО-ЗАПАДНЫЙ ЦЕНТР МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОБЛЕМ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО
ОБЕСПЕЧЕНИЯ» (ФГБНУ СЗЦППО)**

**Ельшазли М.А., Искандаров М.И., Федоров А.И., Слепцов Е.С.,
Племяшов К.В., Лайшев К.А., Винокуров Н.В., Федоров В.И.,
Григорьев И.И., Павлова А.И., Корякина Л.П.**

ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНЫХ ВАКЦИН

Методическое пособие

*Светлой памяти нашего Учителя, профессора
Николая Павловича Овдиенко посвящается*

Новосибирск
2020

УДК 619:616.98

ББК 48.73

П767

Утвержден к печати протокол № 3 от 07 мая 2020 г.

Ученым советом ФГБНУ «Северо-западный центр междисциплинарных исследований проблем продовольственного обеспечения»

Рецензенты:

Найманов А.Х., доктор ветеринарных наук, профессор, заслуженный ветеринарный врач РФ, заведующий лабораторией микобактериозов ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»;

Сочнев В.В., доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой эпизоотологии, паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия».

Ельшазли М.А., Искандаров М.И., Федоров А.И., Слещов Е.С., Племяшов К.В., Лайшев К.А., Винокуров Н.В., Федоров В.И., Григорьев И.И., Павлова А.И., Корякина Л.П.

П767 «Принципы конструирования нового поколения противобруцеллезных вакцин». – Методическое пособие – Новосибирск: Изд. ООО «СибАК», 2020. – 192 с.

DOI: 10.13140/RG.2.2.24092.31366

ISBN 978-5-6044857-3-6

В данной методической пособии изложены материалы многолетних исследований по изучению антигенной активности рекомбинантных ДНК *omp31*, *p39*, *sp41* *V.melitensis* на модельных животных, а также разработка технологического регламента по производству, контролю и применению слабоагглютиногенной вакцины (САВ) из протективного антигена бруцелл против бруцеллеза сельскохозяйственных животных. Обобщены и проанализированы собственные материалы и литературные данные по данному вопросу.

Методическое пособие сотрудникам научно-исследовательских учреждений и вузов, магистров и аспирантов, занимающихся проблемами бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

ББК 48.73

ISBN 978-5-6044857-3-6

© Авторский коллектив, 2020.

© ООО «СибАК», 2020.

ОГЛАВЛЕНИЕ:

Введение	7
Глава 1. Изучение антигенной активности рекомбинатных днк omp31, р39, sp41 <i>B.melitensis</i> на модельных животных ...	11
1.1. Обзор литературы.....	11
1.1.1. Краткий обзор о бруцеллезной инфекции.....	11
1.1.2. Распространение бруцеллеза.....	13
1.1.3. Экономическое значение бруцеллеза.....	15
1.1.4. Специфическая профилактика бруцеллеза.....	16
1.1.5. Открытие новых вакцин и их применение.....	21
1.1.6. Механизм действия ДНК-вакцин.....	23
1.1.7. Иммунный ответ, вызванный ДНК-вакцинами.....	23
1.1.8. Методы трансфекции ДНК-вакцины и ее совершенствование.....	25
1.2. Собственные исследования.....	28
1.2.1. Материалы и методы исследований.....	28
1.2.1.1. Получение антигена.....	29
1.2.1.2. Выделение ДНК и ПЦР-анализ.....	29
1.2.1.3. Экстракция ДНК из агарозного геля.....	30
1.2.1.4. Секвенирование.....	30
1.2.1.5. Клонирования.....	31

1.2.1.6. Экспериментальные испытания на морских свинках.....	36
1.2.2. Результаты исследований.....	36
1.2.2.1. Характеристика штамма Rev-1. Культивирование, биохимическая идентификация.....	36
1.2.2.2. Получения антигена для молекулярно-генетических исследований.....	38
1.2.2.3. Выделение ДНК и ПЦР-анализа.....	40
1.2.2.4. Выделения ДНК из агарозного геля и секвенирования.....	41
1.2.2.5. Расщепления рестриктазой и лигирования вектора со вставкой.....	45
1.2.2.6. Трансформации в E.coli XL1.....	48
1.2.2.7. Выделения и очистки плазмидной ДНК.....	50
1.2.2.8. Антигенная и иммуногенная активности рекомбинантной ДНК omp31, p39, sp41.....	51
1.2.2.9. Влияние на пролиферативную активность и иммунокомпетентных клеток у лабораторных животных.....	56
1.2.2.10. Определения фагоцитарной активности лейкоцитов.....	57
1.3. Заключение.....	59

Глава 2. Изучение слабоагглютиногенной вакцины (СAB) из протективного антигена против бруцеллеза животных..... 66

2.1. Общая характеристика бруцеллеза животных.....	66
--	----

2.1.1. Понятие об основных положениях бруцеллеза животных и человека.....	66
2.1.2. Общая характеристика проблемы бруцеллеза северных оленей.....	72
2.1.3. Источники бруцеллезной инфекции у северных оленей, пути заражения, клинические и патоморфологические изменения.....	77
2.1.4. Биологическая характеристика возбудителя бруцеллеза северных оленей.....	81
2.1.5. Особенности эпизоотологии бруцеллеза домашних северных оленей и ее краткая характеристика.....	85
2.1.6. Современное состояние изученности вопросов специфической профилактики бруцеллеза северных оленей, ее роль и место в системе противобруцеллезных мероприятий	92
2.1.7. Результаты разработки вакцин на основе протективного антигена.....	115
2.1.8. Совершенствование мероприятий по профилактике и борьбе с бруцеллезом животных в новых экономических условиях.....	121
2.2. Производство, контроль и применение слабоагглютиногенной вакцины (САВ) из протективного антигена бруцелл против бруцеллеза сельскохозяйственных животных.....	124
2.2.1. Область применения.....	124
2.2.2. Нормативные ссылки.....	125
2.2.3. Термины и определения.....	127

2.2.4. Требования безопасности и охраны окружающей среды.....	128
2.2.5. Схема технологического процесса производства слабоагглютиногенной вакцины (СAB) из протективного антигена бруцелл.....	129
2.2.6. Изложение технологического процесса производства вакцины.....	129
2.2.7. Технические требования.....	132
2.2.8. Правила приемки.....	133
2.2.9. Методы испытаний.....	134
2.2.10. Транспортировка и хранение.....	137
2.2.11. Порядок применения.....	138
2.2.12. Гарантии изготовителя.....	138
Заключение	138
Список литературы	154

ВВЕДЕНИЕ

Бруцеллез, известный как «волнистая лихорадка», «средиземноморская лихорадка» или «мальтийская лихорадка», является зоонозом, почти всегда передается прямым или косвенным контактом с инфицированными животными или их продуктами. Несмотря на большой прогресс в борьбе с этим заболеванием во многих странах, все еще остаются регионы, где инфекция сохраняется у домашних животных и, следовательно, часто происходит инфицирование населения. Эта опасная инфекция для человека и животных встречается во многих частях мира, особенно в средиземноморских странах Европы, Северной и Восточной Африке, на Ближнем Востоке, в Южной и Центральной Азии, в Центральной и Южной Америке. Часто в ряде стран в официальной статистике не отражается все выявленные случаи. Есть только несколько стран в мире, которые официально свободны от этой болезни, хотя случаи все еще происходят у людей, возвращающихся из эндемичных стран.

Продолжительность инкубационного периода бруцеллезной инфекции у человека составляет несколько месяцев до нескольких лет, протекая часто пожизненно приводя к инвалидности. Ранняя диагностика и лечение антибиотиками значительно сокращают время, в течение которого пациент может быть недееспособным. Тем не менее, существует множество регионов, где эффективная диагностика или лечение недоступны, или где программы по обнаружению и профилактике инфекции у людей и животных не проводятся должным образом.

Хотя гуморальные антитела играют определенную роль в устойчивости к инфекции, основным механизмом защиты бруцеллеза является клеточноопосредованный иммунитет. Клеточный иммунитет включает в себя запуск специфических цитотоксических Т-лимфоцитов и активацию макрофагов, усиливающих их бактерицидную активность, посредством выделения цитокинов (например, гамма-интерферона и фактора некроза опухоли) из специально выделенных хелперных Т-лимфоцитов.

Использование живых вакцин также опасно, поскольку штаммы, такие как *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev-1, не являются полностью авирулентными для людей. Вакцинный штамм *B. abortus* RB-51, имеет низкую патогенность, но все же представляет потенциальную опасность при случайной инъекции и устойчив к рифампицину.

Вакцинация является чрезвычайно важным и эффективным аспектом большинства стратегий борьбы с бруцеллезом, но имеет тот недо-

статок, что результаты диагностики не в полной мере бывают достоверными, т.к. вакцинные штаммы длительное время персистируют в организме вакцинированных животных стимулируя производство гиперчувствительности и антителопродукцию, обнаруживаемых серологическими и аллегрическими реакциями, скрывающие истинное эпизоотологическое состояние поголовья и мешающая оздоровлению хозяйств. Это обстоятельство явилось основной вакцинация крупного рогатого скота в возрасте до шести месяцев и перед осеменением. Однако двукратная иммунизация не улучшило защиту взрослого скота от заболевания бруцеллезом, что выразилось в значительном росте количества неблагополучных пунктов и больного скота. В тоже время использование живых вакцин потенциально опасно, поскольку штаммы, такие как *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev 1, не являются полностью авирулентными для людей. Широко используемы в последнее время вакцина из штамма *B. abortus* RB 51, не индуцирующий гуморальный иммунитет, являясь живой имеет те же недостатки, как и вакцины из штаммов *B. abortus* S19 и *B. melitensis* Rev 1.

В настоящее время нет широко распространенного теста, который способен отличить вакцинированные от инфицированных животных, хотя некоторые тесты находятся под оценкой.

Профилактика бруцеллеза остается одной из проблем ветеринарии и создание эффективных и безопасных вакцин сохраняет актуальность.

Бруцеллы являются факультативными внутриклеточными патогенами, которые могут выживать и размножаться внутри фагоцитарных клеток хозяина таким образом ускользают от бактерицидных факторов гуморального иммунитета и фагоцитоза, приводя тем самым к хронической инфекции. Механизмы, с помощью которых бруцелла уклоняется от внутриклеточного убийства, не полностью поняты. Тем не менее, *Brucella* в конечном итоге становятся секвестрированными в моноцитах и макрофагах ретикулоэндотелиальной системы, таких как лимфатические узлы, печень, селезенка и костный мозг.

На питательных средах бруцеллы образуют как гладкие, так и грубые колонии, соответственно экспрессирующие гладкий липополисахарид (S-LPS) или грубый LPS (R-LPS) в качестве основного поверхностного антигена. S-LPS является сильнейшим АГ по сравнению с другими антигенными молекулами, участвующими в иммунном ответе против бруцеллеза.

В настоящее время для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота используется живые вакцины из штаммов *Brucella abortus* 19 и *Br. melitensis* Rev 1.

Профилактики бруцеллеза животных, с использованием живых вакцин в течение более 60 лет не обеспечила благополучие и по настоящее время основным эффективным методом является диагностика и выбраковка положительно реагирующих, и это продолжается на фоне применения живых вакцин, несмотря на проблемы биобезопасности их применения и специфических недостатков, включая аборт у животных и аллергические реакции и ограничения использования продукции в течение 20 дней после вакцинации.

По этим причинам разрабатываются различные стратегии производства безопасных, нереплицирующихся вакцин, которые легко производятся с постоянным качеством. В последнее время белки наружной мембраны (OMP), поверхностные белки (SP) и периплазматически связывающий белок (p39) идентифицированные у бруцелл рассматриваются как группа иммуногенов для вакцин, отличных от ЛПС.

Основные белки наружной мембраны (OMP) у бруцелл были идентифицированы в начале 1980-х годов и охарактеризованы как потенциальные иммуногенные и защитные антигены. OMP АГ, также известны как факторы, которые влияют на вирулентность *Brucella*. Роль одного из основных OMP, Omp31, в защитном иммунитете против бруцеллезной инфекции изучается в настоящее время несколькими группами ученых. Несмотря на важную роль в иммуногенности и вирулентности OMP АГ использование их в создании вакцин не изучены. Не менее интересными в качестве иммуногена периплазматически связывающий белок *Brucella melitensis* (p39), который действует в качестве Т-клеточного иммунодоминантного антигена бруцелл и вызывает сильную реакцию гиперчувствительности замедленного типа и поверхностный белок (SP) с молекулярной массой 41 кДа (SP41), который связан с бактериальной адгезией и инвазией клеток.

Развитие биологической науки позволяет разработать вакцины, на молекулярном уровне и одним из направлений является создание ДНК вакцины на основе рекомбинантных ДНК omp31, p39, sp41. и изучения их антигенных и иммуногенных свойств на модели морских свинок.

Выбранная тема представляет интерес для науки и практики, а методические подходы, соответствуют современному уровню научных достижений молекулярной биологии и иммунологии.

Несмотря на улучшение эпизоотической ситуации бруцеллеза животных в Российской Федерации, проблема оздоровления поголовья скота окончательно не решена. Выявление заболевших животных и неблагополучных пунктов не только не снижается, но и имеет тенденцию к увеличению. Охват поголовья вакцинацией в 2 раза ниже по сравнению с аналогичными показателями 1990 года. Необходимо уточнение

причин длительного неблагополучия и причин возникновения новых случаев болезни в благополучных хозяйствах.

Характерной современной особенностью является реструктуризация животноводства, создание фермерских и арендных хозяйств, увеличение поголовья животных в личных хозяйствах граждан. Повысилась опасность заноса возбудителей бруцеллеза в благополучные стада. Во многих хозяйствах имеет место проблема дифференциации антител у больных и вакцинированных животных.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности дальнейшего совершенствования диагностики, профилактики и мер борьбы с бруцеллезом животных.

Настоящий лабораторный регламент устанавливает требования к производству, хранению и применению слабоагглютиногенной вакцины (САВ) из протективного антигена бруцелл против бруцеллеза сельскохозяйственных животных.

Разработан в соответствии с требованиями Федерального закона от 27 декабря 2002 года №184-ФЗ «О техническом регулировании» в целях обеспечения нормативной базы для разработки технических регламентов и установления единых норм и требований к номенклатуре показателей качества, а также методам их контроля, транспортированию, хранению и применению, обеспечивающим безопасность слабоагглютиногенной вакцины (САВ) из протективного антигена бруцелл при производстве и использовании.

*Ельшазли М.А., Искандаров М.И., Федоров А.И., Слепцов Е.С.,
Племяшов К.В., Лайшев К.А., Винокуров Н.В., Федоров В.И.,
Григорьев И.И., Павлова А.И., Корякина Л.П.*

Научное издание

ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНЫХ ВАКЦИН

Подписано в печать 31.07.20. Формат бумаги 60x84/16.
Бумага офсет №1. Гарнитура Times. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 12. Тираж 550 экз.

Издательство ООО «СибАК»
630049, г. Новосибирск, Красный проспект, 165, оф. 5.
E-mail: mail@sibac.info

Отпечатано в полном соответствии с качеством предоставленного
оригинал-макета в типографии «Allprint»
630004, г. Новосибирск, Вокзальная магистраль, 3.

16+