
Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

УДК 619:616. 981.5:615.571/572

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СИБИРЕЯЗВЕННОЙ ВАКЦИНЫ СТИ

Белоконов И.И.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Важнейшим мероприятием в профактике сибирской язвы является вакцинация [1, 2, 8]. Во многих странах, в настоящее время, для профилактики сибирской язвы животных используется вакцина, разработанная Sterne в 1937 году на основе бескапсульного варианта 34F2 [11, 12].

В России в настоящее время для профилактики сибирской язвы животных применяется вакцина 55-ВНИИВВ и М [1, 2, 3].

В Украине также используются живые споровые вакцины, приготовленные из бескапсульных вариантов «СБ» и «К79Z» [5, 6].

Введенные под кожу живые споры вакцинных сибиреязвенных штаммов прорастают в вегетативные формы и размножаются. Через 2-3 часа их можно выделить из регионарных лимфатических узлов, а несколько позже и из других лимфатических узлов и внутренних органов [8]. Размножаясь в организме, вакцинные штаммы бациллы антракса синтезируют экзотоксин, который состоит из трёх компонентов: летального, отёчного и протективного, обеспечивающего формирование иммунитета против сибирской язвы [8].

При иммунизации вакциной СТИ в последнее время стали отмечать случаи заболевания сибирской язвой привитых животных, что подтверждается наличием недостаточно напряженного иммунитета. Это явление впоследствии было доказано экспериментально [8]. Поэтому, с 1984 года на всей территории России начали применять новую вакцину из бескапсульного штамма 55-ВНИИВВ и М [3, 6, 8].

Производство споровых сибиреязвенных вакцин основано на Seed-Lot системе. Seed-Lot система это количество спор однородной суспензии необходимой для получения вакцины. Каждый Seed-Lot должен иметь не более, чем три пассажа из культуры, предназначенной для получения безопасной вакцины [9, 10, 11, 12].

Для создания активного иммунитета против сибирской язвы необходимо ввести в организм животного 20-25 миллионов живых спор вакцин СТИ, 55-ВНИИВВ и М, «СБ», «К-79Z» для крупных животных (лошади, рогатый скот, верблюды) и 10 миллионов живых спор для мелких животных (овцы, козы, свиньи) [1, 2, 4, 5].

Вакцина Sterne обеспечивает активный иммунитет у животных при введении 10 миллионов жизнеспособных спор на одну дозу для крупного рогатого скота, буйволов и лошадей и 5 миллионов живых спор на одну дозу для овец, коз и свиней [11, 12].

В США и странах Западной Европы единственным биопрепаратом, применяемым для вакцинации людей против сибирской язвы, является инактивированная сибиреязвенная вакцина, выпускаемая компанией «BioPost Corporation. Она представляет собой бесклеточный фильтрат культуры *B. anthracis*, выращенной в жидкой питательной среде [9, 10]. При производстве вакцины используется токсигенный штамм V770-NR1-R, не образующий капсулу. Фильтрат содержит смесь продуктов жизнедеятельности клеток *B. anthracis*, в том числе и протективный антиген. Компоненты вакцины адсорбированы на гидрооксиде алюминия, используемого в качестве адьюванта.

В России и некоторых других странах лицам, представляющим группу риска заражения сибирской язвой, проводят плановую вакцинацию живой аттенуированной сибиреязвенной вакциной СТИ. В то же время, в других странах живые вакцины не используются, что связано с их низкой безопасностью для человека.

Материалы и методы. Изучение субмикроскопического строения споровой вакцины СТИ осуществлялось методом электронной микроскопии ультратонких срезов содержимого ампулы препарата. Фиксация исследуемого материала проводилась глутаральдегидом и четырёхокисью осмия по методу Келенбергера – Ритера, с последующей заливкой в эпоксидные смолы. Получение ультратонких срезов осуществлялось с помощью ультрамикротомы УМТП-4. Контрастирование ультратонких срезов проводилось уксуснокислым свинцом по методу Рейнольдса.

После обнаружения в вакцинной суспензии бактериофагов, была проведена серия исследований с использованием методов очистки и концентрирования бактериальных вирусов. Очистку бактериофагов, содержащихся в вакциной суспензии, проводили методом дифференциального центрифугирования, начиная с 3000 об/мин и завершая ультрацентрифугированием, которое обеспечивало осаждение и концентрацию бактериофагов. Для изучения строения бактериофагов был использован метод нанесения фаговой суспензии на специальные сеточки, покрытые формваровой пленкой. Контрастирование полученных образцов проводилось фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК). Полученные образцы исследовали в электронном микроскопе ЭМВ-100Л с разрешающей способностью 3А⁰.

Результаты исследований. Поводом для электронно-микроскопических исследований вакцины СТИ послужило то, что в последние годы этот препарат потерял свое значение в ветеринарной медицине и был заменен на другие вакцины, которые производят из штамма 55- ВНИИВВ и М в России и из вариантов «СБ» и «К 79Z» в Украине.

Изучение вакцины СТИ было начато с получения информации об ультраструктуре бацилл и возможного наличия бактериофагов. После первых же исследований ультраструктуры бактерий, находящихся в вакцине и обеспечивающих формирование

противосибирезвенного иммунитета у животных, было установлено сравнительно низкое содержание спор и большое количество разрушенных клеток. Кроме того, четко просматривалось наличие структур, которые идентифицировались как бактериофаги. Создавалось впечатление, что вакцина СТИ представляет собой суспензию разрушенных клеток и бактериофагов.

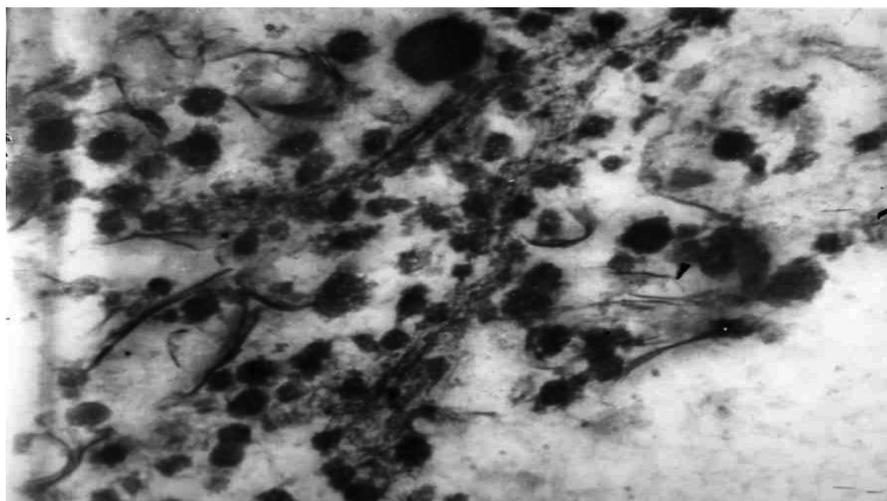


Рис. 1 Ультратонкие срезы содержимого вакцины СТИ (спор и бактериофагов). x 96000

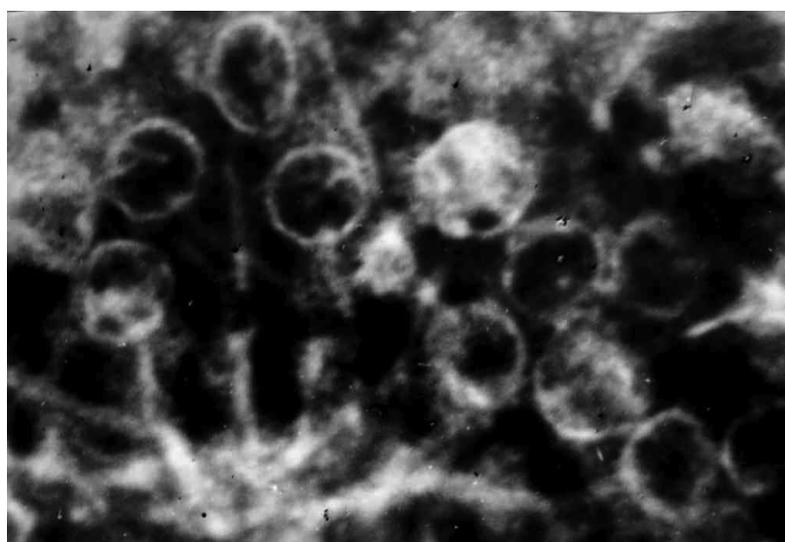


Рис. 2 Сибирезвенные бактериофаги, очищенные дифференциальным центрифугированием. x 126.000

При посеве на МПА и МПБ вакцины СТИ выростала популяция вакцинного штамма, в ультратонких срезах отдельных бацилл которых обнаруживались формирующиеся бактериофаги.



Рис. 3 *Bac. anthracis*. Ультратонкий срез. В цитоплазме бациллы видны формирующиеся бактериофаги. x 56000
Большинство бактерий имели типичное для бациллы антракса вакцинного штамма строение и не содержали бактериофагов.



Рис. 4 *Bac. anthracis*. Ультратонкий срез. x 55000

Если исходить из того, что выделенные фаги были вирулентными, то вся популяция вакцинного штамма могла бы погибнуть. В этой связи можно предположить о существовании в одной популяции умеренных и вирулентных фагов. Либо, в ходе продуктивной фазы умеренные фаги способны вызывать два пути развития инфекций – литической по своему смыслу подобной литическому циклу вирулентных фагов и лизогенной, которая характеризуется тем, что геном умеренного фага переходит в состояние профага, способного присутствовать в клетке в виде самостоятельных репликонов.

Известно, что для создания активного иммунитета против сибирской язвы необходимо ввести о организм животного 20-25 миллионов живых спор для крупных животных (лошади, крупный рогатый скот, верблюды) и 10 миллионов для мелких животных (овцы, козы, свиньи), то такого количества живых спор в 1 см³ данной вакцины не имелось. Отсюда следует, что главной причиной снижения иммуногенных свойств вакцины СТИ могло быть низкое содержание живых спор в препарате.

Таким образом, мы можем полагать о существовании реальной угрозы потери производственных штаммов, применяемых для получения вакцин и продуктов микробного синтеза в результате контаминации их бактериофагами. В этой связи, необходимы специальные разработки для сохранения вакцинных и производственных штаммов от действия бактериофагов, тем более, если учесть, что во всем мире насчитывается всего несколько высокоиммуногенных штаммов, которые пригодны для производства сибиреязвенных вакцин (55-ВНИИВВ и М, Sterne и др.).

Выводы.

1. Методом электронной микроскопии установлена высокая контаминация вакцины СТИ сибиреязвенным бактериофагом, что возможно послужило причиной снижения иммуногенных свойств данного препарата.

2. Популяция сибиреязвенного штамма СТИ-1, по всей видимости, представляет собой лизогенную систему, в которой осуществляется два пути развития инфекции лизогенной характеризующейся тем, что геном умеренного фага переходит в состояние профага, который может существовать в клетке в виде самостоятельных репликонов и литической по своему смыслу подобной литическому циклу вирулентных бактериофагов.

3. Сибиреязвенным вакцинным штаммам необходимы надежные меры биозащиты от контаминации бактериофагами.

Список литературы

1. Бакулов, И.А., В.А.Гаврилов. Оценка эффективности 10-летнего применения вакцины против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВ и М// Ветеринария - №8.-1994-с. 11-15.
2. Бакулов, И.А., Гаврилов В.А Сибирская язва животных и людей// Ветеринарная газета – 2000, №8.
3. Бакулов, И.А. Гаврилов, В.А., Селиверстов, В.В. Сибирская язва (Антракс)//-Владимир – 2001. с. 281.
4. Белоконов, И.И., Апатенко, В.М, Белоконова, Л.А Паразитозоозы в микромире//.Проблемы зооинженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць. Ветеринарні науки – Вип. 7 (31) – 2001р. – с. 20-21.
5. Бусол, В. Постой, В., Блатко, А. Епізоотологічний моніторинг // - Ветеринарна медицина, №3 2002 с.12-14.
6. Завірюха, А.І., Вербицький, П.І., Яковлев, Ю.С., Коломієць, С. Д. Перебіг Сибірки на щепленому поголів'ї // Ветеринарна медицина України. – 2000. - №9. – с.17.
7. Ипатенко, Н.Г. Испытание сибиреязвенных бактериофагов//Ветеринария-2000.- №6.- с.22-23.
8. Ипатенко, Н.Г, Бахтаров, С.И., Филиппов Н.В. Профилактика сибирской язвы в России //.-Ветеринарная №4, 2000г – с 6-8.
9. Лобзин, Ю.В., Волжанин, В.М., Захаренко, С.М. Сибирская язва.//КМАХ-2002, ТИ, №.-с. 33.
10. Пименов, Е.В., Кожухов, В.В., Строчко, Ю.И. Создание вакцин против сибирской язвы. Человек и его здоровье. <http://bio.septemder.ru/2002/02/6.html>.
11. Anthrax manual of diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, Sthedition, 2004 с. 17.
12. Sigh, V., Khanna, H. Chopra ,A.P., Mehra, V. A dominant negative mutant of Bacillus anthracis protective antigen igibits anthrax toxin action in vivo. J. Biol Chem 2001 276: 22090=4.

ELECTRONIC MICROSCOPIC RESEARCHES OF ANHTRAX VACCINE STI

Belokonov I.I.

Kharkiv State Zooveterinary Academy.

The results of electronic and microscopic investigations of live spore vaccine have been presented in the article. A large number of bacteriophages, a lot of breakdown cells and a low number of live spores have been revealed. The above mentioned data caused the decrease in the immunogenic properties of the vaccine under investigation, its removal from the production and from use of the vaccine in veterinary medicine.