



The “animalization” influence on the specific activity of a live plague vaccine in the model animal experiments

Tatyana Ponomareva

Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases named after Masgut Aikimbaev, Vaccine Laboratory, Almaty, Kazakhstan

Abstract

Objective: Assessment of the “animalization” impact on the immunogenicity and viability of EV live plague vaccine.

Methods: In this research we have used a vaccine strain of *Yersinia pestis* EV (a RIEH line), and a strain 231 from the National Depository of highly dangerous microorganisms of the Kazakh Scientific Center of Quarantine and Zoonotic Diseases (KSCQZD).

For the cultivation and evaluation of cultural, biochemical properties, as well as phage lysability of the vaccine strain we used Hottinger agar, Hottinger broth, peptone water with 1% glycerol, 1% sucrose, 1% lactose, 1% rhamnose and Andred indicator, a sterile 0.9% sodium chloride, and also plague diagnostic bacteriophages L-413 and Pokrovsky, produced in KSCQZD, and determination of the cell concentration using 10 units standard turbidity.

We carried out “animalization” of the vaccine by its intravenous infusion to 5 rabbits weighting from 2 to 2.5 kg, with subsequent (after 3-4 hours) isolation of the vaccine strain culture from rabbit’s internal organs.

We evaluated the protective activity in acute experiments of contamination of previously immunized guinea pigs weighing from 250 to 350 g (by a number of survived animals), and immunogenicity by ED50 value for all series of “animalized” and “not animalized” EV vaccine.

The viability (percent of live cells) was determined by the number of colonies grown on Hottinger agar compared with the concentration of bacteria marked on an ampoule. As the percentage of viable microbial cells in a series, we accepted the arithmetic mean calculated for the three ampoules of the same series.

Results: Indicators of the specific activity of the vaccine series prepared with the inclusion in the process of an “animalization” stage showed their significant growth. Significant increase in the number of surviving after contamination guinea pigs in combination with a significant reduction ED50 indicates that short stay of the vaccine strain in a rabbit body leads to a significant increase in protective activity (immunogenicity) of the finished vaccine. The number of viable cells in the final vaccine increases, too.

Conclusions: Short-term (within 3-4 hours) stay of the 2nd generation culture during the process of a live plague vaccine production greatly enhances its immunogenicity (protective activity). The vaccine obtained with the inclusion in its production process of the “animalization” step contains a significantly greater number of viable microbes, as compared to conventional technology without “animalization”.

Keywords: plague – a plague live vaccine – animalization – immunogenicity – viability.

J Clin Med Kaz 2016; 1(39):25-29

Автор для корреспонденции: Пономарева Татьяна Сергеевна, Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций имени М. Айкимбаева, Адрес: 050054, Алматы, ул. Капальская, 14. Тел.: +7 (727) 223 38 21, +7 777 355 41 30. E-mail: 572202@gmail.com; 572202@mail.ru.

ЖАНУАРЛАРҒА ҮЛГІЛІК ТӘЖІРІБЕ ЖАСАУДА «АНИМАЛИЗАЦИЯЛАУДЫҢ» ТІРІ ОБА ВАКЦИНАСЫНЫҢ СПЕЦИФИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ӘСЕРІ

Пономарева Т.С.

М.Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

Тұжырымдама

Мақсаты: «анимализациялаудың» EV тірі оба вакцинасының иммуногенділігіне және өміршеңдігіне әсерін бағалау.

Зерттеу әдістері: Жұмыста М.Айқымбаев атындағы Қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығының (ҚКЗИҒО) республикалық аса қауіпті микроорганизмдер депозитариясынан алынған *Yersinia pestis* EV (ЭГҒЗИ желісінің) вакциналық штаммы, *Y.pestis*, 231 вирулентті штаммдары пайдаланылды.

Вакциналық штаммдардың қоздырғыштық, биохимиялық, фагологиялық қасиеттерін бағалау және оларды өсіру үшін Хоттингер агары, Хоттингер сорпасы, 1% глицерин, 1% сахароза, 1% лактоза, 1% рамноза және 0,9% натрий хлоридтің тазартылған ертіндісімен Андред индикаторы бар пептон суы, Л-413 диагностикалық оба бактериофагтары және ҚКЗИҒО Покров өнімі қолданылды, сонымен қатар 10 бірлікке бұлдырлық стандартын пайдалану арқылы жасушалардың концентрациясы анықталды.

Вакцинаны «анимализациялау» оны салмағы 2-2,5 кг болатын 5 қоянның тамырларының ішіне егу және кейіннен (3-4 сағаттан кейін) қоянның ішкі мүшелерінен вакцина штаммының қоздырғышын бөліп алу арқылы жүргізілді.

Нәтижесі: Технологиялы процеске «анимализация» кезеңін қосу арқылы алынған вакциналар сериясының төл белсенділігінің көрсеткіштері артқаны анықталды. Теңіз шошқаларына ауру жұқтырғаннан кейін тірі қалғандарының санының артуы мен ED50 көрсеткішінің айтарлықтай төмендеуі вакцина штаммының көжек ағзасында аз уақытқа болуы дайын вакцинаның протективті белсенділігін (иммуногенділігін) арттыратындығының дәлелі болып табылады.

Қорытынды: тірі оба вакцинасын алу барысында оның культурасының екінші генерацияда аз уақытқа болуы (3-4 сағат) вакцинаның иммуногенділігін (протективті белсенділігін) арттырады.

Маңызды сөздер: оба - тірі оба вакцинасы – анимализация - иммуногенділік - өміршеңдік.

ВЛИЯНИЕ «АНИМАЛИЗАЦИИ» НА СПЕЦИФИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНЫ В МОДЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ НА ЖИВОТНЫХ

Пономарева Т.С.

Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций имени М. Айкимбаева, Алматы, Казахстан

Резюме

Цель: оценка влияния «анимализации» на иммуногенность и жизнеспособность живой чумной вакцины EV.

Методы: В работе использован вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV (линии НИИЭГ) и вирулентный штамм *Y.pestis*, 231 из республиканского депозитария особо опасных микроорганизмов в Казахском научном центре карантинных и зоонозных инфекций имени М.Айкимбаева (КНЦКЗИ).

Для культивирования, оценки культуральных, биохимических, фагологических свойств вакцинного штамма использовали агар Хоттингера, бульон Хоттингера, пептонную воду с 1% глицерина, 1% сахарозы, 1% лактозы, 1% рамнозы и индикатором Андреде, стерильным 0,9% раствором натрия хлорида, бактериофаги чумные диагностические Л-413 и Покровский производства КНЦКЗИ, а также определение концентрации клеток с использованием стандарта мутности на 10 единиц.

«Анимализацию» вакцины проводили путем ее внутривенного введения 5 кроликам весом 2-2,5 кг и последующего (через 3-4 часа) выделения культуры вакцинного штамма из внутренних органов кролика.

Протективную активность оценивали в опытах заражения предварительно иммунизированных морских свинок весом от 250 до 350 г (по количеству выживших животных), иммуногенность - по величине ED₅₀ для всех серий «анимализированной» и «неанимализированной» вакцины EV.

Жизнеспособность (процент живых клеток) определяли по количеству выросших колоний на агаре Хоттингера в сравнении с концентрацией бактерий, указанной на ампуле. За процент жизнеспособных микробных клеток в серии принимали среднюю арифметическую величину, рассчитанную для трех ампул одной серии.

Результаты: Показатели специфической активности серий вакцины, полученных с включением в технологический процесс этапа «анимализации», показало их значительный рост. Достоверное увеличение числа выживших после заражения морских свинок в сочетании с существенным снижением показателя ED₅₀, свидетельствуют о том, что кратковременное пребывание вакцинного штамма в организме кролика приводит к значительному повышению протективной активности (иммуногенности) готовой вакцины. Увеличивается также и количество жизнеспособных клеток в готовой вакцине.

Выводы: Кратковременное (в течение 3-4 часов) пребывание культуры 2-ой генерации в процессе получения живой чумной вакцины существенно увеличивает ее иммуногенность (протективную активность).

Вакцина, полученная с включением в технологический процесс ее производства, этапа «анимализации» содержит достоверно большее количество жизнеспособных микробов, по сравнению с традиционной технологией без «анимализации».

Ключевые слова: чума - живая чумная вакцина – анимализация – иммуногенность - жизнеспособность

Введение

Чума относится к карантинным особо опасным природно-очаговым зоонозным инфекциям. Природные очаги чумы занимают более 7% суши земного шара, в том числе около 40% территории Казахстана [1]. Важным звеном в системе эпидемиологического надзора и профилактики чумы и в системе мер, направленных на ликвидацию последствий возможных биотеррористических актов с применением возбудителя этой инфекции является вакцинация [2]. В Казахстане и в других странах СНГ для специфической профилактики чумы используется живая чумная вакцина, разработанная еще в 30-ые годы прошлого века на основе штамма *Y.pestis*, EV. Хотя иммунизация этой вакциной снижает как заболеваемость (в среднем в 10 раз), так и летальность, она относится к группе вакцин со слабой иммуногенностью [3]. Это обуславливает необходимость поиска подходов к повышению ее иммуногенности.

Различные словари дают различные толкования термина «анимализация» [4,5]. Мы под этим термином понимаем изменение биологических свойств микроорганизмов и вирусов, после их прохождения через организм животных. Еще со времен Луи Пастера в биологии и медицине известно, что прохождение возбудителей инфекционных болезней через организм животных, в том числе лабораторных, приводит к изменению их биологических свойств. В первую очередь это используется для влияния на показатели вирулентности. Таким образом, например, был получен вакцинный штамм вируса бешенства. Заражение биопробных животных повышает возможности выделения возбудителя туляремии по сравнению с прямым посевом исследуемого материала [6]. Влияние же «анимализации» на иммуногенные свойства микробов практически не изучалось.

Цель настоящего исследования – оценка влияния «анимализации» на специфическую активность (иммуногенность и жизнеспособность) живой чумной вакцины EV.

Материалы и методы

В работе использован вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV (линии НИИЭГ) и вирулентный штамм *Y.pestis*, 231 из республиканского депозитария особо опасных микроорганизмов в Казахском научном центре карантинных и зоонозных инфекций имени М.Айкимбаева (КНЦКЗИ).

Для культивирования, оценки культуральных, биохимических, фагологических свойств вакцинного штамма использовали агар Хоттингера, бульон Хоттингера, пептонную воду с 1% глицерина, 1% сахарозы, 1% лактозы, 1% рамнозы и индикатором Андреде, стерильным 0,9% раствором натрия хлорида, бактериофаги чумные диагностические Л-413 и Покровский производства КНЦКЗИ, а также определение концентрации с использованием стандарта мутности на 10 единиц.

Дизайн исследования – доклинические экспериментальные исследования протективной активности, иммуногенности и жизнеспособности серий живой чумной вакцины, полученных с использованием традиционной технологии ее получения и полученных с включением в технологический процесс этапа «анимализации» вакцины.

При получении живой чумной вакцины использовали штамм *Y.pestis* EV (линии НИИЭГ). Вакцину получали следующим образом:

- хранящуюся ампулу с лиофильно высушенной вакциной разводили стерильным 0,9% раствором натрия хлорида. Проверяли чистоту культуры бактериоскопическим методом.
- регидратированную вакцину засеивали на ряд

пробирок со скошенным агаром Хоттингера и выращивали в течение 48 часов при 28 °С (культура 1-ой генерации). Контролировали ее культуральные, морфологические и ферментативные свойства.

- культуру 1-ой генерации смывали стерильным 0,9% раствором натрия хлорида и засеивали на чашки Петри с агаром Хоттингера и выращивали их в течение 48 часов при 28°С (культура 2-ой генерации). Контролировали ее культуральные, морфологические и ферментативные свойства.

- культуру 2-ой генерации смывали стерильным 0,9% раствором натрия хлорида и засеивали на матрацы с агаром Хоттингера и выращивали их в течение 48 часов при 28°С (культура 2-ой генерации). Контролировали ее культуральные, морфологические и ферментативные свойства.

- выросшие на матрацах микробы (культура 3-ей генерации) смывали средой для высушивания, содержащей 10% сахарозы, 1 % желатина, 1,5 % глютаминовокислого натрия, 0,5 % тиомочевины и 0,05 % пептона. Чистоту культуры проверяли бактериоскопически.

- полученную микробную взвесь вакцинного штамма разливали по ампулам (по 2 мл), замораживали и лиофильно высушивали, запаивали.

- высушенную вакцину хранили при температуре 2 - 8°С.

В работе использовано три серии вакцины, полученной по традиционной технологии без «анимализации».

«Анимализацию» вакцины проводили по следующей схеме:

- культуру 2-ой генерации разводили стерильным 0,9% раствором натрия хлорида до концентрации 2x10⁹ микробных клеток/мл и вводили внутривенно (в краевую вену уха) кролику в объеме 1 мл.

- через 3-4 часа после введения животное забивали и вскрывали в стерильном боксе. Видимых патологоанатомических изменений органов не наблюдалось. С соблюдением правил асептики удаляли легкие, селезенку, печень и кровь. Кровь и взятые органы (методом отпечатков) в стерильных условиях засеивали на чашки Петри с агаром Хоттингера (каждый орган на отдельную чашку Петри) и выдерживали в течение 48 часов при 28°С.

- после инкубации отбирали типичные колонии и пересеивали их в пробирки со скошенным агаром Хоттингера (каждый орган в отдельную пробирку) и выдерживали в течение 48 часов при 28°С.

- выросшие микробы смывали бульоном Хоттингера и пересеивали в матрацы с бульоном Хоттингера. Контроль на отсутствие посторонней микрофлоры в засеянной культуре проводили, высеивая остатки микробной взвеси в пипетке по 0,1 – 0,3 мл на три чашки с агаром и одну пробирку с бульоном Хоттингера, рН 7,3+ 1.

- После инкубации в течение 48 часов при 28°С проводили посев выросшей культуры на матрацы с агаром Хоттингера. Выдерживали в течение 48 часов при 28 °С.

- выросшие на матрацах микробы («анимализированная» культура) смывали средой для высушивания и готовили серию вакцины, так как описано выше (разливали, замораживали, сушили, запаивали и хранили).

Всего было получено 5 серий «анимализированной» вакцины с использованием беспородных кроликов весом 2-2,5 кг.

Изучение протективной активности и иммуногенности проведено на морских свинках. Для проведения эксперимента отбирались здоровые животные одного пола и возраста с одинаковой массой тела. Отбор животных проводился рандомизированно, т.е. распределялись по группам случайным образом (процедура рандомизации) и имели одинаковую возможность получать исследуемый («анимализированная» вакцина) или контрольный препарат («неанимализированная» вакцина). Морские свинки для этого эксперимента были выбраны потому, что эта модель заражения лабораторных животных является стандартной при выполнении экспериментов с *Y. pestis*, в частности при оценке протективной (иммуногенной) активности чумных вакцин.

Протоколы проведения опытов (№№ 9-12) были рассмотрены и одобрены на заседании биоэтической комиссии КНЦКЗИ и проводились с соответствии с законодательством Республики Казахстан (Правила проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан, утвержденные Приказом Министра здравоохранения № 442 от 25 июля 2007 года; СТ РК 1613-2006 «Надлежащая лабораторная практика. Основные положения»).

Для сравнения использовали три серии вакцины, приготовленные без «анимализации» и 5 серий вакцины, полученных с этапом «анимализации».

Сравнение «анимализированных» и «неанимализированных» серий вакцины проводили по показателям протективной активности, иммуногенности и жизнеспособности.

Протективную активность оценивали в опытах по заражению 199 морских свинок весом от 250 до 350 г. Морских свинок предварительно иммунизировали «анимализированной» или «неанимализированной» вакциной внутривенно в дозе 106 микробных клеток, через 21 день всех животных заражали вирулентным штаммом *Y.pestis*, 231. За животными наблюдали в течение 20 дней после заражения. Результат оценивали по количеству погибших животных.

Иммуногенность серий анимализированной и неанимализированной вакцины оценивали на морских свинках массой (300 + 50) г и оценивали по величине ED₅₀. Для иммунизации использовали односуточную агаровую культуру второй генерации, выращенную при температуре (27 + 1)0 С. Микробную взвесь, равную по концентрации 10 единицам ОСО мутности готовили в 0,9% растворе натрия хлорида и вводили морским свинкам в объеме 0,5 мл шприцем, вместимостью 1 мл (ГОСТ 18137-77) с пределом отклонений по вместимости 0,05 мл подкожно в дозах 40, 200, 1000 и 5000 микробных тел. На каждую дозу брали по 10 животных. Контрольное заражение животных проводили на 21 сутки после иммунизации.

Заражающая подкожная доза для морских свинок составляла 200 DCL (Dosiscertaletalis = LD100) вирулентного штамма *Y.pestis*, 231, 1 DCL которого не превышала для 100 микробных тел.

Одновременно для контроля заражали 10 неиммунизированных морских свинок, из них 5 – 1 DCL и 5 – 200 DCL. Все животные контрольной группы погибли от чумы в течение первых суток. За иммунизированными животными наблюдали в течение 20 суток после заражения вирулентным штаммом *Y.pestis*, 231.

ED50 вычисляли по формуле: $\lg ED50 = \lg D_n - d (\hat{a}Li - 0,5)$, где – логарифм кратности разведений;

$\lg D_n$ – логарифм максимальной иммунизирующей (фактической) дозы;

Li – отношение числа животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему числу, которым эта доза была введена; индекс 1 соответствует номеру дозы, если считать наименьшую из испытанных доз первой;

$\hat{a}Li$ – сумма значений Li , найденных для всех испытанных доз.

Жизнеспособность (процент живых клеток) определяли по количеству выросших колоний на агаре Хоттингера в сравнении с концентрацией бактерий, указанной на

ампуле. За процент жизнеспособных микробных клеток в серии принимали среднюю арифметическую величину, рассчитанную для трех ампул одной серии.

В работе применили различные варианты статистического сравнения серий (Стьюдента, Сухатме, частотного анализа). Результат считали значимым при $P < 0,05$.

Результаты

Результаты исследования протективной активности, иммуногенности и жизнеспособности готовых серий вакцины приведены в таблице 1.

Таблица 1 Показатели специфической активности живой чумной вакцины без и после «анимализации».

Серия вакцины	«Анимализация»	Протективная активность*	Количество жизнеспособных клеток	ЕД50
серия 40	Не проводилась	12/23 (54,1± 10,4%)	29,1%	6045
серия 15	Не проводилась	11/20 (55± 11,1%)	29,7%	5241
Серия 88	Не проводилась	7/39 (17,9± 6,1%)	26,5%	3624
Всего без «анимализации»	Не проводилась	30/82 (36,6±5,3%)**	28,4±1,0%***	4970±711**
Серия 01	+ / кролик	16/21 (76,1±9,3%)	75,5%	84
Серия 02	+ / кролик	13/24(54,1±10,2%)	47,3%	351
Серия 03	+ / кролик	24/24 (100%)	50,1%	348
Серия 05	+ / кролик	19/24 (79,2±8,3%)	40,0%	1210
Серия 010	+ / кролик	22/24 (91,7±5,6%)	45,1%	612
Всего с «анимализацией»	+ / кролик	94/117 (80,3±3,7%)**	51,6±6,2%***	521± 191**

Примечание: * - в числителе – абсолютное количество выживших животных, в знаменателе - количество вакцинированных зараженных животных, в скобках - относительное количество выживших животных и его средняя квадратическая ошибка; ** и ***средние арифметические величины указанных показателей и их среднеквадратические ошибки; ** - $P < 0,01$; *** - $0,02 < P < 0,05$

Как видно из таблицы, количество выживших животных при использовании серий вакцины, полученных без «анимализации» варьировало от 18 до 55%, а при проведении «анимализации» от 54 до 100%. В целом «анимализация» достоверно ($P < 0,01$) в 2,2 раза увеличивала выживаемость морских свинок, что свидетельствует о том, что эта процедура повышает протективную активность живой чумной вакцины.

В сериях вакцины, полученных без «анимализации» показатель ЕД50 колебался от 3624 до 6045, а в сериях вакцины, полученной с включением в технологический процесс этапа «анимализации» - от 84 до 1210. В целом, «анимализация» достоверно ($P < 0,01$) в 9,5 раза снизила показатели ЕД50.

Количество жизнеспособных клеток в сериях вакцины, полученных без «анимализации» колебалось от 27 до 30%, а при использовании «анимализации» от 40 до 76%. В целом «анимализация» достоверно ($P < 0,05$) в 1,8 раза увеличивала количество жизнеспособных клеток.

Обсуждение

Основными показателями, характеризующими специфическую активность живой чумной вакцины, являются ее протективная активность (иммуногенность) и количество жизнеспособных бактерий в конечном продукте (жизнеспособность). В спецификации качества на живую чумную вакцину, зарегистрированную и используемую в Казахстане, ЕД 50 должен быть не более 10000, а количество жизнеспособных клеток должно быть не менее 25%. Как видно все использованные серии вакцины, полученные без этапа «анимализации» отвечали этим требованиям. Однако изучение показателей специфической активности серий вакцины,

полученных с включением в технологический процесс этапа «анимализации», показало их значительный рост. Достоверное увеличение числа выживших после заражения морских свинок в сочетании с существенным снижением показателя ЕД50, свидетельствуют о том, что кратковременное пребывание вакцинного штамма в организме кролика приводит к значительному повышению протективной активности (иммуногенности) готовой вакцины. Увеличивается также и количество жизнеспособных клеток в готовой вакцине.

Причины описанного феномена повышения специфической активности живой чумной вакцины в результате кратковременного пребывания вакцинного штамма в организме кролика («анимализации») пока не ясны. Возможно, что увеличение количества жизнеспособных клеток и повышение иммуногенности вакцины связаны между собой и повышение иммуногенности вакцины обусловлено увеличением числа жизнеспособных бактерий. Однако возможны и другие причины повышения иммуногенности. Для более полного понимания процесса и объяснения выявленного факта, необходимо проведение генетических исследований вакцинного штамма до и после «анимализации».

Выводы

Кратковременное (в течение 3-4 часов) пребывание культуры 2-ой генерации в процессе получения живой чумной вакцины существенно увеличивает ее иммуногенность (протективную активность).

Вакцина, полученная с включением в технологический процесс ее производства, этапа «анимализации» содержит достоверно большее количество жизнеспособных микробов, по сравнению с традиционной технологией без «анимализации».

Литература

1. Burdelov L.A. Atlas rasprostraneniya osobo opasnyh infekcij v Respublike Kazahstan (Atlas spread of especially dangerous infections in the Republic of Kazakhstan), Almaty, 2012, 232 p.
2. Inglesby T.V., Dennis D. T., Henderson D.A. et al. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense, JAMA, 2000, No.283.-pp.2281–2290.;
3. Feodorova V.A., Motin V.L. Plaque vaccines. In: Vaccines against bacterial biothreat pathogens, India, 2011, p.175 – 233.
4. Great Dictionary of Foreign slov.- “IDDK” Publishers, Moscow, 2007, World, 630 p.
5. Chudinov AN, Dictionary of Foreign Words that are included in the Russian language. Ed. AN Chudinov, Ed. 3rd, Corrected. and ext., SPb .: Issue VI Guba, 1910. 500 p.
6. Olsuf’ev N.G. Taksonomija, mikrobiologija i laboratornaja diagnostika vozбудitelja tuljaremii (Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of tularemia pathogen). Moskva, Medicina, 1975. 192p.