



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013153454/10, 03.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.12.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.12.2013

(45) Опубликовано: 20.03.2015 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2095409 C1, 10.11.1997. RU 2180349 C1, 10.03.2002. RU 2180916 C1, 27.03.2002. RU 2173342 C1, 10.09.2001. RU 2321629 C1, 10.04.2008. US 20110229507 A1, 22.09.2011. COHEN S. et al., Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant Bacillus anthracis spore vaccines protect against anthrax, Infect. Immun., 2000, Vol.68, no.8, pp.4549-4558

Адрес для переписки:

601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр.1
ГНУ ВНИИВВ и М

(72) Автор(ы):

Селянинов Юрий Олегович (RU),
Егорова Ирина Юрьевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-исследовательский
институт ветеринарной вирусологии и
микробиологии Россельхозакадемии (RU)

(54) АТТЕНУИРОВАННЫЙ ШТАММ *Bacillus anthracis* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к бескапсульному природно-ослабленному штамму *Bacillus anthracis*. Штамм *B. anthracis* 363/11 депонирован в коллекции штаммов микроорганизмов ГНУ ВНИИВВ и М Россельхозакадемии под №363. Штамм предназначен для разработки средств

специфической профилактики сибирской язвы. Изобретение позволяет расширить спектр защитного действия, увеличить иммуногенность, уменьшить иммунизирующую дозу и реактогенность вакцинного штамма против сибирской язвы. 5 табл., 5 пр.

RU 2 544 951 C1

RU 2 544 951 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 544 951** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013153454/10, 03.12.2013**

(24) Effective date for property rights:
03.12.2013

Priority:

(22) Date of filing: **03.12.2013**

(45) Date of publication: **20.03.2015** Bull. № 8

Mail address:

**601125, Vladimirskaja obl., Petushinskij r-
n, pos. Vol'ginskij, ul. Akademika Bakulova, str. 1 GNU
VNIIVV i M**

(72) Inventor(s):

**Seljaninov Jurij Olegovich (RU),
Egorova Irina Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie
Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut
veterinarnoj virusologii i mikrobiologii
Rossel'khozakademii (RU)**

(54) **ATTENUATED STRAIN Bacillus anthracis FOR DEVELOPING MEANS OF SPECIFIC PREVENTION OF ANTHRAX**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain of *B. anthracis* 363/11 is deposited in the collection of strains of microorganisms of State Scientific Institution of Russian National Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology of Russian Agricultural Academy No. 363. The strain is made for developing the means of

specific prevention of anthrax.

EFFECT: invention enables to expand the range of protective action, to increase immunogenicity, to reduce immunising dose and reactogenicity of the vaccine strain against anthrax.

5 tbl, 5 ex

C 1
1 6 9 5 1
2 5 4 4 9 5 1
R U

R U
2 5 4 4 9 5 1
C 1

Изобретение относится к области ветеринарной микробиологии, касается бескапсульного природно ослабленного штамма *Bacillus anthracis* 363/11 и может быть использовано в научно-исследовательских и биотехнологических центрах для создания средств специфической профилактики сибирской язвы.

5 В связи с широким распространением сибирской язвы на территории Российской Федерации в прошлом и способностью спор сибиреязвенного микроба сохраняться в почвенных очагах десятками и даже сотнями лет благополучие по данной болезни, главным образом, сохраняется за счет проведения поголовной вакцинации с/х животных. Несмотря на это в России ежегодно регистрируется от 2-х до 16 спорадических случаев
10 сибирской язвы среди восприимчивых животных, большая часть из которых подвергалась профилактической иммунизации. К числу основных причин возникновения вспышек сибирской язвы можно отнести неэффективно проведенные вакцинации, нарушение условий хранения биопрепаратов и циркуляцию в природе изолятов, иммунологически не соответствующих применяемым вакцинным штаммам [Ю.О. Селянинов, И.Ю. Егорова, 2012].
15

В настоящее время в Российской Федерации для обеспечения биологической безопасности по сибиреязвенной инфекции в животноводстве используется вакцина живая из бескапсульного авирулентного вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ, а в здравоохранении - из бескапсульного вакцинного штамма СТИ-1. За рубежом для
20 профилактики этой болезни у животных и людей применяются вакцины из штаммов *B. anthracis* Sterne (34 F₂), Вейбридж (Европа, США и др.), Ихтиман (Болгария), К79Z (Украина), 1190-R (Румыния) и др. [Г.Г. Онищенко и др., 1999]. Все перечисленные вакцинные штаммы не содержат плазмиды рХО2, отвечающей за выработку капсулы, основного фактора патогенности сибиреязвенного микроба.
25

Получение штаммов *B. anthracis*, перспективных для создания на их основе живых вакцин, проводили двумя основными способами: искусственной элиминацией плазмиды рХО2 у ослабленных капсулообразующих штаммов с последующей селекцией бескапсульных вариантов и отбором бескапсульных штаммов *B. anthracis* из природно
30 ослабленных полевых изолятов.

Первым способом из вирулентных капсулообразующих изолятов сибиреязвенного микроба были получены вакцинные штаммы 1190-R (1934), Sterne (1937), Вейбридж (1939), Takahaschi (1939), Мактесвар (1939), СТИ (1940), НИИЭГ К-II (1940), Шуя-15 (1949), вторым - штамм Ихтиман и 55-ВНИИВВиМ [Э.Н. Шляхов, 1960; R.S. Slavtchev, 1967; Г.Г. Онищенко и др., 1999]. Однако при сравнительном изучении специфической
35 активности наиболее известных вакцинных штаммов (СТИ, ГНКИ, Ихтиман, 34-F₂, 55-ВНИИВВиМ) была установлена достоверная и существенная разница в их иммуногенности и защитных спектрах по отношению к некоторым полевым изолятам, вплоть до полной незащищенности от заражения [И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, 1991]. Для преодоления указанных недостатков авторы предлагают использовать химические
40 вакцины на основе протективного антигена, комбинированные вакцины на основе спор одного штамма и протективного антигена другого штамма, двух- и трехвалентные вакцины на основе различных штаммов, а также вести поиск новых штаммов, обладающих наиболее полноценным антигенным составом.

Близким аналогом предлагаемого изобретения является бескапсульный авирулентный штамм 55-ВНИИВВиМ, полученный селекцией во ВНИИВВиМ из изолята С-63, выделенного сотрудниками Харьковского зооветинститута из трупа свиньи в 1963 году, и используемый для изготовления вакцины против сибирской язвы животных. Штамм
45

55-ВНИИВВиМ в прививных дозах $12,5 \times 10^7$ и $25,0 \times 10^7$ спор индуцирует выработку напряженного противосибиреязвенного иммунитета в организме вакцинированных животных (мелкий и крупный рогатый скот, соответственно) и защищает от 40 до 100% поголовья от заражения полевыми вирулентными изолятами [И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, 1991].

Недостатками штамма являются его низкая антигенность, недостаточно широкий спектр защитного действия по отношению к полевым изолятам, циркулирующим на территории России и остаточная реактогенность. При получении сибиреязвенных гипериммунных сывороток с использованием 4 различных схем иммунизации титры антител к антигенам штамма 55-ВНИИВВиМ во всех случаях были в 2-8 раз ниже, чем к антигенам штамма Sterne (34F₂). Изучение сотрудниками ГНУ ВНИИВВиМ геномного полиморфизма музейных культур *B. anthracis* показало, что некоторые из них имеют уникальные генотипы, существенно отличающиеся от молекулярных типов большинства изученных изолятов возбудителя сибирской язвы, в том числе и штамма 55-ВНИИВВиМ. Так изолят, выделенный в Удмуртской ССР в 1989 году, отличающийся по генотипу от штамма 55-ВНИИВВиМ, вызвал заболевание крупного рогатого скота спустя месяц после его иммунизации вакциной из штамма 55-ВНИИВВиМ. О наличии у вакцины из штамма 55-ВНИИВВиМ реактогенности свидетельствуют сообщения ветеринарных специалистов о поствакцинальных осложнениях у коз - образование серозных отеков на месте введения препарата.

Целью изобретения является получение нового авирулентного штамма *Bacillus anthracis*, обладающего более широким спектром защитного действия, большей иммуногенностью и меньшими, по сравнению со штаммом-аналогом, реактогенностью и иммунизирующей дозой.

Поставленная цель достигается путем выделения нового природно ослабленного бескапсульного штамма сибиреязвенного микроба. Заявляемый штамм 363/11 выделен сотрудниками ГНУ ВНИИВВиМ в 2011 году от павшего подсвинка.

Штамм 363/11 депонирован в Коллекции штаммов микроорганизмов ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии под инв. №363.

Штамм *Bacillus anthracis* 363/11 характеризуется следующими культурально-морфологическими, иммунобиологическими и биохимическими признаками.

Культуральные свойства. Факультативный аэроб. Оптимальная температура роста на твердых и жидких питательных средах (36 ± 1)°С, оптимум рН ($7,4 \pm 0,2$). Имеет типичные для вида *B. anthracis* культурально-морфологические свойства: при культивировании в жидких питательных средах бульон остается прозрачным, на дне формируется осадок в виде комочка ваты; на твердых питательных средах образует матовые, шероховатые колонии R-, реже RO-формы, диаметром 3-4 мм. На средах, содержащих сыворотку крови лошади и в присутствии CO₂, а также в организме восприимчивых лабораторных животных не образует капсульного полипептида.

Морфологические свойства. Существует в двух морфологических формах: вегетативной и споровой. В мазках с питательных сред грамположительные палочки располагаются в виде длинных цепочек, которые в местах их соединения выглядят обрубленными или слегка вогнутыми. Споры, окрашенные по Циль-Нильсену, имеют овальную форму, располагаются преимущественно центрально. Клетки жгутиков не имеют, неподвижны.

In vivo (в организме белых мышей) формирует цепочки, состоящие из 4, 8, 16, 21 и более члеников.

Биохимические свойства. Вызывает α -гемолиз эритроцитов барана. Ферментирует с образованием кислоты без газов целлобиозу, сахарозу, трегалозу. Не разлагает аргинин. Окисляет глюкозу до ацетона. Восстанавливает нитраты до нитритов. Продуцирует каталазу, не образует щелочную фосфатазу.

5 Антигенные свойства. Соматический антиген штамма 363/11, полученный путем термоэкстракции, вступает в специфическое взаимодействие с сибиреязвенной преципитирующей сывороткой, а супернатан суточной бульонной культуры - с глобулином противосибиреязвенным из сыворотки крови лошади.

10 При подкожном введении овцам споровой суспензии штамм индуцирует выработку агглютинирующих антител.

Слабо чувствителен к воздействию сибиреязвенного фага Fah-ВНИИВВиМ и высокочувствителен к фагу Rd/Ph/6.

Плазмидный состав. Содержит в геноме последовательности *rag*- гена, гены капсульного оперона отсутствуют ($pXO1^+pXO2^-$).

15 Остаточная вирулентность. LD_{50} для аутбредных белых мышей живой массой 18-20 г составляет $3,162 \times 10^5$ спор, для морских свинок живой массой 200-300 г - свыше 10^8 спор.

20 Реверсibilitätность. Не восстанавливает способность к капсулообразованию на протяжении 7 последовательных пассажей на морских свинках (на 8 пассаже прекращает размножаться в организме морских свинок) и 10 пассажей на аутбредных белых мышках.

25 Реактогенность. Слабореактогенен для морских свинок: при подкожном введении 10^7 спор на месте введения образуются серозные отеки, редко с последующими изъязвлениями. Не реактогенен для овец при введении 10^7 спор подкожно в области бесшерстного участка подмышечной впадины.

30 Иммуногенные свойства. В прививной дозе 10^6 - 10^7 спор вызывает формирование у привитых животных (морских свинок, овец) напряженного иммунитета против капсулообразующих референс-заражающих штаммов (II вакцина Ценковского, 17JB) и полевых изолятов.

Для подтверждения преимущества настоящего изобретения приведены примеры конкретного его исполнения.

Пример 1. Описание основных биологических свойств вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ и бескапсульного природно ослабленного штамма 363/11.

35 Характеристика биологических свойств штаммов 55-ВНИИВВиМ и 363/11 представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика биологических свойств штаммов 55-ВНИИВВиМ и 363/11

№ п/п	Признаки	Характеристика штамма	
		55-ВНИИВВиМ	363/11
1.	Морфология <i>in vitro</i>	палочки, споры	палочки, споры
2.	Морфология <i>in vivo</i>	палочки, соединенные в цепочки по 2, 4, 6 и иногда 8 члеников	палочки, соединенные в цепочки по 4, 8, 16, 21 и более члеников
3.	Подвижность	отсутствует	отсутствует
4.	Окраска по Граму	грамположительная	грамположительная
45 5.	Рост в МПБ	«комоч ваты» в прозрачном бульоне, формирование на 5-е сутки пристеночного кольца	«комоч ваты» в прозрачном бульоне
6.	Рост на плотных питательных средах	R-формы с типичными «локонами»	R и RO-формы с типичными «локонами»

7.	Тип гемолиза, уровень продукции экзотоксина	β -гемолиз, средний	α -гемолиз, высокий
8.	Чувствительность к фагу Fah-ВНИИВВиМ	слабо чувствителен	слабо чувствителен
9.	Чувствительность к фагу Rd/Ph/6	чувствителен (#)	чувствителен (#)
10.	Наличие капсулы	отсутствует	отсутствует
11.	Продукция токсина in vitro и in vivo	продуцирует	продуцирует
12.	Наличие rag-гена	имеется	имеется
13.	Наличие sar-гена	отсутствует	отсутствует

Представленные в таблице 1 данные свидетельствуют о наличии у обоих штаммов свойств, типичных для вакцинных штаммов (стойкая утрата капсулообразования).

Различия между штаммами заключаются в способности экспрессировать in vitro различные виды гемолизина на разных уровнях.

Пример 2

Остаточная вирулентность штаммов 55-ВНИИВВиМ и 363/11 определена на модели аутбредных белых мышей живой массой 18-20 г и морских свинок живой массой 200-300 г путем подкожной инокуляции последним в объеме 0,25 см³ споровых суспензий серийных разведений патогенов, приготовленных с пятикратным шагом. Наблюдение за животными проводилось в течение 10 суток. По окончании срока наблюдения определяли отношение числа животных, павших от введения данной дозы, к общему числу животных, которым была введена эта доза. Величина LD₅₀ рассчитывалась по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева (табл.2).

Вид животных	Показатели LD ₅₀ для штаммов, спор	
	55-ВНИИВВиМ	363/11
Аутбредные белые мыши	115,0×10 ⁵	3,162×10 ⁵
Морские свинки	свыше 10 ⁸	свыше 10 ⁸

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что оба штамма характеризуются сходными показателями LD₅₀ для морских свинок и относятся к группе авирулентных штаммов. По показателю LD₅₀ для аутбредных белых мышей штаммы 363/11 и 55-ВНИИВВиМ имеют отличия, но по классификации Э.Н. Шляхова и Е.В. Груз (1978) оба штамма также относятся к группе авирулентных культур.

Пример 3.

В экспериментах на морских свинок определены показатели иммунизирующих доз штаммов 55-ВНИИВВиМ и 363/11, защищающих от гибели 50% вакцинированных животных (ИмД₅₀) после заражения референс-заражающей культурой сибирезвонного микроба штамма №71/12 в дозе 200 ЛД₅₀. Результаты сравнительного определения на морских свинок ИмД₅₀ штаммов V. anthracis 55-ВНИИВВиМ и 363/11 приведены в табл.3.

Показатель	Штамм 55-ВНИИВВиМ	Штамм 363/11
ИмД ₅₀ для морских свинок в отношении референс-заражающего штамма №71/12	(2,9-3,4)×10 ⁵ спор	2,951×10 ⁴ спор

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что показатель ИмД₅₀ для штамма 363/11 в 10 раз ниже, чем для штамма 55-ВНИИВВиМ, т.е. для индукции у морских свинок

защитного иммунитета, предохраняющего 50% вакцинированных животных от гибели после введения спор штамма №71/12 в дозе 200 ЛД₅₀, требуется в 10 раз меньшая вакцинирующая доза.

Пример 4.

5 В экспериментах на морских свинках показано, что спектр защитного действия штамма 363/11 шире, чем штамма 55-ВНИИВВиМ. Процент выживаемости вакцинированных штаммом 363/11 морских свинок, зараженных референс-заражающими культурами сибирезвеноного микроба (№№71/12, 17JB, 76) и полевыми изолятами, выделенными в различных регионах России и в разное время (№№81, 304, 364), был
10 выше, чем для морских свинок, вакцинированных штаммом 55-ВНИИВВиМ (табл. 4).

Таблица 4 Иммуногенные свойства штаммов <i>V. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ и 363/11 в испытаниях на морских свинках							
Штамм <i>V. anthracis</i>	Иммунизирующая доза, спор	Процент защиты вакцинированных животных от заражения различными сибирезвеноными штаммами (заражающая доза 200 ЛД ₅₀)					
		71/12	76	81	304	364**	17JB
363/11	10 ⁷	80	100*	100*	50	40	100
55-ВНИИВВиМ	1,2×10 ⁷	80	100***	40***	25	10	100

Примечание: * - прививная доза штамма составила 10⁶ спор; ** - заражающая доза штамма составила 1200 ЛД₅₀; *** - данные Бакулова И.А. и Гаврилова В.А. (1991)

20 Из представленных в таблице 4 данных видно, что вакцинация животных штаммом 363/11 защищает 100, 50 и 40 процентов морских свинок от заражения культурами вирулентных полевых изолятов *V. anthracis* штаммы №№81, 304, 364, соответственно, в то время как процент защиты вакцинированных животных штаммом 55-ВНИИВВиМ для указанных полевых изолятов составляет 40, 25 и 10%, соответственно. Иммуногенная
25 активность штаммов 363/11 и 55-ВНИИВВиМ в отношении референс-заражающих культур штаммов №№71/12, 17JB, 76 отличий не имела.

Пример 5.

Иммуногенную активность штаммов определяли в опытах на овцах возрастом 1-1,5 года из стада, не подвергавшегося вакцинации против сибирской язвы. Овцам вводили
30 под кожу по 10-12 млн спор испытуемых штаммов в объеме 1 мл.

Через 21 день вакцинированных овец заражали внутрикожным введением споровых культур высоковирулентных сибирезвеноных штаммов в дозах, составляющих для овцы не менее 10 безусловно смертельных доз. Наблюдение за зараженными животными вели в течение 10 дней. Овцы, у которых сформировался напряженный иммунитет
35 против соответствующего заражающего штамма, оставались клинически здоровыми. Незащищенные животные погибли в течение 3-5 дней после заражения с признаками острой формы сибирской язвы. Специфический характер гибели овец подтверждался микроскопией мазков крови и бактериологическим анализом.

Таблица 4 Иммуногенные свойства штаммов <i>V. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ и 363/11 на овцах				
Штамм <i>V. anthracis</i>	Иммунизирующая доза, спор	Штаммы, использованные для заражения (200 LD ₅₀)		
		№76	№304	№81
363/11	10 ⁷	выжила	выжила	выжила
55-ВНИИВВиМ	1,2×10 ⁷	выжила	пала	пала

45 Данные таблиц свидетельствуют о том, что спектр защитного действия штамма 363/11 шире, чем у штамма 55-ВНИИВВиМ. Т.е. иммунизация животных штаммом 363/11, в отличие от штамма 55-ВНИИВВиМ предохраняет их от заражения полевыми

изолятами *B. anthracis*, иммунологически не соответствующими штамму 55-ВНИИВВиМ (№№304 и 81).

Источники информации

1. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. - Л.: Медгиз, 1962. - С.85.
2. Бакулов, И.А. Иммунопрофилактика сибирской язвы животных /И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов // Вести, с.-х. науки. - 1991. - №8. - С.128-131.
3. Селянинов, Ю.О. О некоторых причинах недостаточной эффективности мероприятий по специфической профилактике сибирской язвы в РФ / Ю.О. Селянинов, И.Ю. Егорова // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. - Ставрополь. - 2012. - С.69-70.
4. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко [и др.] - М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. - 448 с.
5. Шляхов, Э.Н. Эпидемиология, диагностика и профилактика сибирской язвы / Э.Н. Шляхов. - Кишинев: Карта Молдовеняскэ, 1960. - 116 с.
6. Шляхов, Э.Н. Титрация ЛД₅₀ на мышах как метод определения вирулентности сибиреязвенных бацилл / Э.Н. Шляхов, Е.В. Груз // Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: Матер. X пленарного заседания межведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. - М., 1978. - С.97-99.
7. Slavtchev, R.S. Etude comparative de la propriete oedematogene L'une nouvelle souche acapsulogene de *Bacillus anthracis* (souche Ihtiman) / R.S. Slavtchev // Arch. Inst. Pasteur, Tunis. - 1967. - V.44, №2-3. - P.229-233.

Формула изобретения

Аттенуированный штамм 363/11 *B.anthraxis* для разработки средств специфической профилактики сибирской язвы, депонирован в Коллекции микроорганизмов ГНУ Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии под №363.