

Веретенников Владислав Валерьевич

**РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОЙ
БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Санкт-Петербург - 2022 г.

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии им. В.П. Урбана федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель: Джавадов Эдуард Джавадович,
доктор ветеринарных наук, профессор, академик
Российской академии наук

Официальные оппоненты: Ирза Виктор Николаевич,
доктор ветеринарных наук, доцент, ФГБУ
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ ВНИИЗЖ), главный научный сотрудник
информационно-аналитического центра
Россельхознадзора

Луницин Андрей Владимирович,
кандидат ветеринарных наук, старший научный
сотрудник, ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр вирусологии и
микробиологии», (ФГБНУ ФИЦВиМ), заместитель
директора по производству и качеству

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий» Российской академии наук (СФНЦА РАН).

Защита состоится «___» _____ 2022 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 220.059.03 при ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д.5, тел/факс (812) 388-36-31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» по адресу: 196084, Санкт-Петербург, ул. Черниговская д. 5 и на официальном сайте <http://spbguvm.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Н.В. Кузнецова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность. В связи с интенсивным и стремительным развитием современного птицеводства возрастает спрос потребителя на высококачественную продукцию, что в свою очередь достигается благодаря повышению интенсификации и концентрации производства. Все это приводит к значительной нагрузке на организм птицы, которая имеет определенный генетический потенциал. Стремление производителей к достижению большей прибыли и высокой эффективности повышает риски возникновения инфекционных болезней. Одной из таких является инфекционная бурсальная болезнь (ИББ) (Стегний Б. Т., 2018).

ИББ приводит к невысоким прямым экономическим потерям, связанным со специфической смертности в 30 %, однако косвенные потери намного выше (Бакулин В.А., 2006). В основном они связаны с иммуносупрессивным состоянием птиц после контакта с вирусом ИББ, который поражает бурсу Фабрициуса и приводит к разрушению лимфоцитов.

Иммуносупрессивное состояние птиц приводит к вторичным бактериальным инфекциям, повышенной смертности, задержке роста и выбраковке. Наиболее ярко это наблюдается, когда болеет молодняк, который даже после выздоровления продолжает отставать в росте и продуктивности, поскольку функции иммунной системы полностью не восстанавливаются. Это часто является основной причиной респираторных болезней у цыплят, а также низких титров антител после вакцинаций (Джавадов Э. Д., 2004).

Вакцинация является наиболее важной мерой борьбы с ИББ. В промышленном птицеводстве применяются в основном живые и инактивированные вакцины, но интенсивное использование живых аттенуированных вакцин против ИББ может привести к увеличению вирулентности этого патогена из-за мутации. К тому же живые вакцины все равно вызывают иммуносупрессию у молодняка кур, а высокие денежные затраты на использование инактивированных вакцин не позволяет просто перейти на них (Веретенников В.В., 2021). В связи с этим возрастает актуальность разработки рекомбинантных вакцин, которые экономически эффективны и не вызывают иммуносупрессию. Капсидный белок VP2 уже давно остается в центре внимания разработки рекомбинантных вакцин, поскольку отвечает за образование защитного иммунного ответа против ИББ. Вакцинированные куры, у которых происходит синтез вируснейтрализующих антител к капсидному белку VP2, устойчивы к инфекционной бурсальной болезни (Jackwood D.J., 2016).

Внедрение рекомбинантной вакцины для профилактики ИББ позволяет полностью или частично заменить живые вакцины против данной болезни, предотвращает развитие иммунодепрессивных состояний, значительно снижает уровень проявления секундарных инфекций и, как следствие, резко снижает или исключает применение антибиотиков в схеме лечебно-профилактических мероприятий. Это способствует получению экологически чистой безопасной продукции, не содержащей антибиотиков. Поэтому исследования данной темы

являются актуальными.

За рубежом и на территории Российской Федерации для специфической профилактики инфекционной бурсальной болезни применяется несколько рекомбинантных субъединичных вакцин: Quadractin VP2 и Gumbin VP2 (Abic Biological Laboratories Ltd, подразделение Phibro Animal Health), но эти вакцины разработаны и производятся в Израиле. На данный момент нет отечественных аналогов этих вакцин, поэтому разработка рекомбинантной вакцины является актуальной и обеспечивает пищевую и биологическую безопасность нашей страны (Петрова О. Г., 2019).

1.2. Степень разработанности темы. За последние три десятилетия было опубликовано множество исследований по синтезу рекомбинантного вирусного структурного белка VP2 (rVP2), основного защитного антигена вируса ИББ.

Изначально Fahey K.J. и Oppling V. в 1989 году пытались синтезировать белок VP2 и создать на его основе рекомбинантную вакцину, но столкнулись с некоторыми сложностями, например, с тем, что денатурированный белок VP2 не индуцировал выработку нейтрализующих антител у цыплят.

Также уже основываясь на этом опыте, были использованы различные системы экспрессии, такие как *Escherichia coli* (Jackwood D.J.; 2016, Rong J., 2007), дрожжи (Fahey K.J., 1991; Pitcovski J., 1996), вирус оспы птиц (Heine H.G., 1991), бакуловир (Vakharia V.N., 1993), и даже системы экспрессии растений (Wu H., 2004).

Слитый белок, состоящий из VP2 и куриного интерлейкина-2 который, как считается, повышает иммуногенность, был разработан в 2005 году Y. Liu и испытан в качестве потенциальной вакцины (Liu Y., 2005). Также в 2007 году была разработана вакцина на основе мультимимотопного белка r5EPIS (Wang Y.S., 2007).

В экспериментальных исследованиях по вакцинации с использованием rVP2 были получены положительные результаты (от частичных до 100%) по защите птиц от ИББ.

В Российской Федерации также многие авторы занимались изучением рекомбинантных белков вируса ИББ. Луговская Н.Н. и Щербакова Л.О. разрабатывали иммуноферментный анализ на ИББ с использованием рекомбинантного белка VP3. Овчинникова Е.В. занималась сравнением первичной структуры фрагмента гена VP2 вакцинных штаммов и полевых изолятов вируса инфекционной бурсальной болезни кур. Также стоит отдельно отметить большой вклад Джавадова Эдуарда Джавадовича как в развитии прогрессивных методов вакцинопрофилактики при ИББ, так и в развитии современной вакцинологии.

Тем не менее, несмотря на множество публикаций, и разработок, данная тематика все еще остается малоизученной и требует дальнейшего теоретического и практического углубления.

1.3. Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы является разработка рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить нуклеотидную последовательность гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни.

2. Разработать алгоритм синтеза рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни на дрожжевой системе экспрессии (*P. pastoris*).

3. Изучить безвредность, стерильность и антигенную активность экспериментальных серий рекомбинантной вакцины против ИББ.

4. Определить концентрацию рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни в вакцине для получения иммунитета к ИББ у иммунизированных кур.

1.4. Научная новизна. Впервые была разработана рекомбинантная вакцина нового поколения на основе белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни эпизоотического штамма, выделенного на территории Российской Федерации.

В ходе работы с эпизоотическим штаммом «Синявинский» вируса ИББ, последовательность гена белка VP2 которого была использована для создания рекомбинантной вакцины, подобраны праймеры. При филогенетическом анализе данного штамма в сравнении с эталонными и высоковирулентными штаммами было установлено, что эпизоотический штамм вируса ИББ «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82.

Экспериментальным путем, в условиях вивария, доказана безвредность и антигенная активность экспериментальных серий рекомбинантной вакцины против ИББ. Кроме того, определена стерильность данной вакцины. Действие данной вакцины на организм птицы было исследовано с применением комплекса серологических, вирусологических, микробиологических и молекулярно-генетических методов.

Предложено внедрить рекомбинантную вакцину для профилактики ИББ, что позволило бы частично заменить живые и инактивированные вакцины против данной болезни и полностью импортные рекомбинантные вакцины.

1.5. Теоретическая и практическая значимость. Впервые на территории Российской Федерации синтезирован рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ на дрожжах *Pichia pastoris*. Разработан алгоритм получения рекомбинантного белка, так как в отечественной ветеринарной науке практически отсутствует понимание работы экспрессионных систем на основе *P. pastoris* и производства рекомбинантных белков вируса ИББ. Кроме того, вызывает большой интерес и выбор нуклеотидной последовательности белка, на основе которого будет основана рекомбинантная вакцина, так филогенетический анализ штаммов из разных регионов показывает существенные различия при их сравнении. Поэтому доказано, что для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, лучше использовать штаммы,

выделенные на территории Российской Федерации

Кроме теоретической значимости разработка рекомбинантной вакцины против ИББ несет в себе и большую практическую значимость. Так как существует множество проблем при выращивании промышленных птиц, с которыми сталкиваются производители при использовании живых и инактивированных вакцин. Доказано, что применение рекомбинантной вакцины является безвредным и не ведет к иммунодепрессивному состоянию птиц, однако при использовании живых вакцин на птицефабриках этого нельзя избежать.

Сегодня российское животноводство зависит от импортных ветпрепаратов и вакцин: 85% иммунобиологических лекарств, которые используются в российском животноводстве, – импортные. Поэтому разработка и производство отечественных вакцин на территории Российской Федерации обеспечивает пищевую и биологическую безопасность нашей страны.

Разработана безвредная и эффективная рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни. Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни. Экспериментально установлена иммунизирующая доза препарата, показана возможность оценки антигенной активности на естественно-восприимчивых животных.

Проведенные исследования были поддержаны грантом, предоставляемым ФГБОУ ВО СПбГУ на тему: «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адъювантов – иммуностимуляторов».

1.6. Методология и методы исследований. В работе использовали методологические принципы, учитывающие молекулярно-биологические особенности вируса ИББ и дрожжей *P. pastoris*, а также условия содержания птицы на птицефабриках, режим кормления и поения, факторы передачи возбудителя, схемы вакцинации на птицефабриках.

В работе использованы следующие методы исследований: клинический, патологоанатомический, вирусологический, серологический, бактериологический, молекулярно-генетический и биоинформационные методы исследования, включающие использование современного программного обеспечения (выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с помощью программы ClustalW, а филогенетические деревья были сгенерированы с использованием программы MEGA 11)

Объектом исследования служил вирус ИББ. Для выделения гена последовательности VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни и для разработки рекомбинантной вакцины был использован эпизоотический штамм «Синявинский» (антигенно родственен эталонному штамму «52/70»).

1.7. Реализованный личный вклад. Диссертация является результатом исследования автора в период с 2018 по 2021 гг. Результаты исследований получены автором лично или при его определяющем участии. Вклад соискателя заключается в участии в выборе направления научных исследований,

разработке цели и задач исследования, проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, формулировании выводов и практических предложений. В статьях, опубликованных совместно с соавторами, большая часть работы выполнена диссертантом. Соавторы не возражают против использования данных результатов.

1.8. Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изученная нуклеотидная последовательность рекомбинантного оболочечного гликопротеина вируса ИББ (VP2) из штамма «Синявинский», филогенетически близка к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70».

2. Введение цыплятам кур несушек рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни вызывает формирование титра антител, способного защитить цыпленка при попадании в организм патогенного вируса.

3. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни стерильна, безвредна, антигенна активна и состоит из оболочечного гликопротеина VP2, дрожжевой среды, вируса инфекционной бурсальной болезни, и адьюванта.

1.9. Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность работы подтверждается использованием различных методов исследований на сертифицированном оборудовании, а также статистической обработкой полученных данных.

Материалы исследований научной работы были представлены:

- на 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 2019;

- на XX Международной конференции Российского отделения Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству", Сергиев Посад, 2020;

- на национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 2021;

- на X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», Санкт-Петербург, 2021.

1.10. Публикации результатов исследований. Основные положения диссертации изложены в 8 научных работах, из них 2 - в периодических изданиях, входящих в перечень российских научных рецензируемых журналов для опубликования основных результатов диссертаций, утвержденных ВАК Министерства образования и науки РФ.

1.11. Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 114 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, практические предложения, перспективы дальнейшей разработки, список использованных сокращений, список использованной литературы, приложение.

Иллюстрационный материал диссертации включает 18 рисунков и 3 таблицы. Список использованной литературы включает 174 наименований, в том числе 130 иностранных источника.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1. Материалы и методы исследования

Исследование проводили в период с 2018 по 2021 годы на базе кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО СПбГУВМ) Министерства сельского хозяйства Российской Федерации. Тема диссертационной работы являлась составной частью научно-исследовательской работы по гранту, предоставляемым ФГБОУ ВО СПбГУ на тему: «Создание нового поколения вакцинных препаратов для птиц на основе рекомбинантных антигенов и адьювантов – иммуностимуляторов».

Опыт по синтезу рекомбинантного белка в дрожжах *P. pastoris* выполняли в несколько этапов.

Первым этапом был подбор праймеров к последовательности гена-интереса для амплификации её методом ПЦР.

Второй этап это градиентная ПЦР нуклеотидной последовательности гена-интереса и электрофорез этой последовательности в агарозном геле, с последующей очисткой при помощи набора «Evrogen Cleanup standart kit» (Евроген, Россия).

Следующий этап - это лигирование ПЦР-продукта в промежуточный вектор pAL2-T и трансформация бактериальных клеток *Escherichia coli* (штамм DH5 α), с последующей селекцией трансформантов на среде с ампициллином.

Четвертый этап - это выделение плазмидной ДНК с вставкой из бактериальных клеток после их наращивания и анализ структуры плазмид с помощью рестрикционного анализа. Параллельно с этим проводилась трансформация бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pPICZ α A, которая используется при синтезе рекомбинантных белков в дрожжевых клетках, с последующим культивированием на среде с зеоцином. Также в этот этап входило выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток и препаративная рестрикция рестриктазами EcoRI и XbaI полученных плазмид, с последующим дефосфорилированием и очисткой в агарозном геле.

Пятый этап - это лигирование полученных фрагментов и трансформация лигазной смесью бактерий *E. coli*, с последующим отбором трансформантов на среде LB с зеоцином и проверкой, выделенной плазмиды в рестрикционном анализе. Также в этот этап входила трансформация полученной плазмидой дрожжей *P. pastoris* (штамм GS115) методом электропорации и отбором трансформантов на среде YEPDS с зеоцином, с последующей проверкой рестрикционным анализом.

Шестой этап - это синтез белка VP2 с использованием сред VMGY и VMMY, с последующей концентрацией и очисткой дрожжевой среды с использованием колонок Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

Также был поставлен опыт *in vivo* на цыплятах кросса Ломан Браун и Ломан Уайт (Lohmann Brown и Lohman White) с использованием рекомбинантной вакцины. Эксперимент на цыплятах кросса Ломан Браун и Ломан Уайт проводили на базе вивариев Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». В работе использованы следующие методы исследований: клинический, патологоанатомический, серологический, вирусологический, молекулярно-генетический и статистический.

Материалом для лабораторных исследований служили образцы сыворотки крови птиц, а также ткани бursy Фабрициуса. Лабораторные исследования содержания антител в сыворотке крови проводили в Научно-исследовательском консультационно-диагностическом центре по птицеводству ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Схемы и результаты исследований приведены в соответствующих разделах диссертации.

2.1.1. Вирус инфекционной бурсальной болезни

В качестве источника гена оболочечного гликопротеина VP2 использовали эпизоотический штамм инфекционной бурсальной болезни «Синявинский» (антигенно родственен эталонному штамму «52/70»), полученный в компании ООО «Кронвет».

Вирусный материал получен после расплодок на развивающихся СПФ эмбрионах кур (Specific Pathogen Free) и приготовлен в виде осветленного гомогената (20 %) инфицированных эмбриональных тканей на изотоническом фосфатном буфере (pH 7,2-7,6).

2.1.2. Штаммы бактерий и дрожжей

Для наработки плазмид в работе использовали штамм бактерий *Escherichia coli* DH5 α (fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Ф80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17).

В работе использовали штаммы дрожжей *P. pastoris* X-33 (дикий тип) (из коллекции ФГБОУ ВО СПбГУ).

2.1.3. Плазмиды

Для клонирования последовательности гена оболочечного гликопротеина VP2 был использован вектор pAL2-T от фирмы Евроген. А для экспрессии гена оболочечного гликопротеина VP2 в дрожжах был использован другой вектор pPICZ α A, Thermo Fisher Scientific, США). Этот вектор обеспечивает высокоуровневую, индуцируемую метанолом экспрессию интересующего гена в *Pichia* и может быть использованы в любом штамме *Pichia*, включая X-33, SMD1168H и KM71H. Вектор широко используется при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*.

2.1.4. Филогенетический анализ

Для проведения филогенетического анализа нуклеотидную последовательность гена белка VP2 штамма «Синявинский» инфекционной бурсальной болезни сравнивали с последовательностями эталонных и высоковирулентных штаммов. Для этого из международных баз данных (GenBank) брали последовательности таких штаммов как: F52/70 ((United Kingdom; HG974565), D78 (Netherlands; AF499929), Cu-1 (Germany; X16107), GA- 1 (USA; EF418034), 23/82 (Germany; AF362773), STC (D00499), 641_Russia (Russia; MF142556), 716_Russia (Russia; MF142563), 630_Russia (Russia; MF142554), 727_Russia (Russia; MF142565), 713_Russia (Russia; MF142562) .

Дендрограмму строили на основе гомологии нуклеотидных последовательностей гена VP2 эпизоотического штамма, эталонных (классических) и высоковирулентных.

Выравнивание нашей и эталонных последовательностей было выполнено с помощью программы ClustalW, программы множественного выравнивания последовательностей. Филогенетические деревья были сгенерированы с использованием программы MEGA 11 методом «Neighbor-Joining».

2.1.5. Методы работы с рекомбинантной ДНК

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили в буферах, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Рестрикционную смесь инкубировали в течение 1 часа при 37°C в термостате. Дефосфорилирование вектора производили при помощи фосфатазы FastAP в буферах, предложенных фирмой-производителем фермента (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Лигирование фрагментов ДНК проводили при помощи T4 ДНК лигазы (Евроген, РФ) при условиях, рекомендованных фирмой-изготовителем фермента.

2.1.6. Концентрация и очистка белка

Концентрацию и очистку белка проводили при помощи набора колонок Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit.

2.1.7. Определение концентрации белка

Определение концентрации белка в полученном препарате определяли с помощью прибора NanoDrop 2000c, Thermo Scientific.

2.1.8. Адьюванты

В качестве адьюванта использовали 6% гидроксид алюминия (ГОА), который добавляли к жидкости, содержащей рекомбинантный белок до конечной концентрации 0,3 % от общего объема вакцины. Полученные препарат смешивали на аппарате «Vortex» в течение 10 минут и вводили животным не ранее чем через 18 часов после приготовления.

2.2. Результаты собственных исследований

2.2.1. Конструирование плазмид, содержащих ген VP2

На первом этапе клонировали в составе плазмиды pAL2-T последовательность гена VP2. Тотальную РНК выделяли из образцов гомогената. Используя выделенную РНК в качестве матрицы, проводили синтез кДНК методом обратной транскрипции (ОТ). При этом использовали геноспецифичный обратный праймер (VP2-R).

Полученную кДНК в свою очередь использовали для последующей амплификации последовательности гена VP2 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом использовали праймеры VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

VP2- EcoRI -F 5'- AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3' VP2- XbaI-R 5'- AtctagaAATGCTCCTGCAATCTTCAG -3'

Праймеры содержали сайты рестрикции: EcoRI и XbaI.

Полученный фрагмент гена VP2 встраивали в плазмиду pAL2-T. Лигазной смесью трансформировали ДНК в клетки бактерий E.coli. Отбор трансформантов осуществляли на среде LB с ампициллином, IPTG и X-gal. Плазмида pAL2-T-VP2 (Рис. 1), выделенная из нескольких клонов, была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R (Рис. 2).

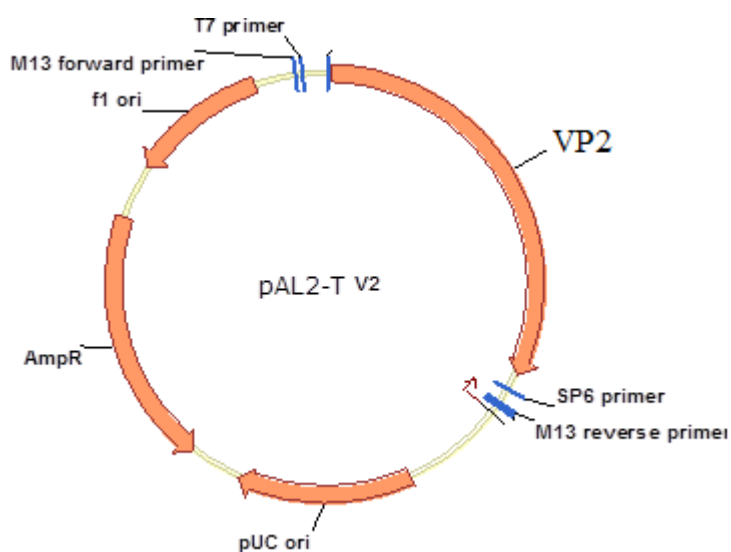


Рисунок 1 – Карта плазмиды pAL2-T- VP2.

Плазмида содержит фрагмент гена VP2, ориджины репликации (f1 ori и pUC ori), ген бета-лактамазы, кодирующий устойчивость к ампициллину (AmpR)

Как видно из рисунка 1 плазмида pAL2-T-VP2 содержит в своем составе нуклеотидную последовательность белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни, а также последовательность нуклеотидов (f1 ori и pUC ori), на которых начинается инициация репликации. Кроме того, в плазмиде pAL2-T-VP2 есть участок (AmpR), отвечающий за устойчивость к ампициллину.

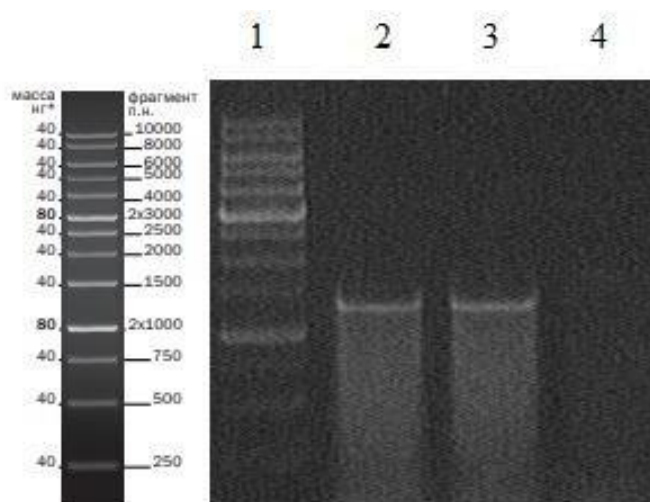


Рисунок 2 - Электрофореграмма продукта ПЦР-реакции плазмиды рAL2-T-VP2 с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

На рисунке 2 видна электрофореграмма продукта ПЦР-реакции, сверху обозначены номера дорожек:

Дорожка №1-Ladder 1 кВ (Евроген, Россия)

Дорожка №2- результаты рестрикции плазмиды рAL2-T-VP2 (клон№1)

Дорожка №3- результаты рестрикции плазмиды рAL2-T-VP2 (клон№2)

Дорожка №4-отрицательный контроль

По свечению фрагментов в дорожке №2, №3 с маркером молекулярных весов можно определить размер вставки, по нашим расчетам длина нуклеотидной последовательности белка VP2 составляет 1339 пар нуклеотидов (п.н.) Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.) Также структуру плазмиды проверили с помощью рестрикционного анализа(Рис. 3)

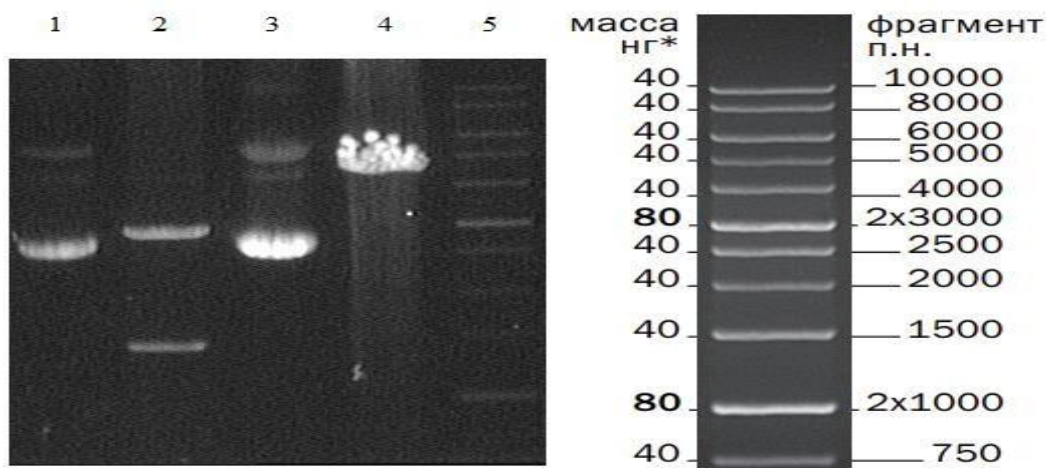


Рисунок 3 - Электрофореграмма результатов рестрикции плазмиды рAL2-T-VP2 по EcoRI и Xba I.

Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому. На рисунке 3 изображены результаты электрофореграммы рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 по EcoRI и Xba I, сверху обозначены номера дорожек:

Дорожки №1 и №3- нативная плазида pAL2-T-VP2

Дорожка №2- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T-VP2 по сайту EcoRI и XbaI (фрагменты 3000 + 1339 п.н.)

Дорожка №4- результаты рестрикции плазмиды pAL2-T по EcoRI (фрагмент 4139 п.н.)

Дорожка №5- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)

В результате рестрикции в дорожке №2 четко видны свечение фрагментов нативной плазмиды в районе 3000 пар нуклеотидов и вставки VP2 1339 пар нуклеотидов. В дорожке №4 видно свечение фрагментов в районе 4400 пар нуклеотидов, поскольку рестрикция плазмиды pAL2-T только по EcoRI.

Предварительный этап клонирования последовательности гена VP2 в плазмиде pAL2-T позволил эффективно проанализировать его нуклеотидную последовательность. Для этого мы использовали Сэнгеровское секвенирование с праймерами M13, места посадки которых находятся в составе плазмиды.

В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность.

При сравнении её с известной последовательностью гена VP2 (GenBank: KJ699103.1) с использованием алгоритма BLAST было обнаружено одиннадцать нуклеотидных замен. Десять из них оказались молчащие и не приводят к изменению аминокислотной последовательности белка. Последняя приводит к замене фенилаланина (F) на лейцин (L).

Также был проведен филогенетический анализ штамма «Синявинский» инфекционной бурсальной болезни. В результате была построена дендрограмма (рис. 4).

В результате филогенетического анализа установлено, что эпизоотический штамм «Синявинский» более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ, чем к другим классическим штаммам Cu-1, Ga-1, D78, STC и 23/82.

Далее последовательность гена VP2 встраивали в вектор pPICZ α -A, используемый при синтезе рекомбинантных белков в дрожжах *P. pastoris*. Для этого плазмиды pAL2-T-VP2 и pPICZ α A обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XbaI и EcoRI. pPICZ α A дополнительно дефосфорилировали.

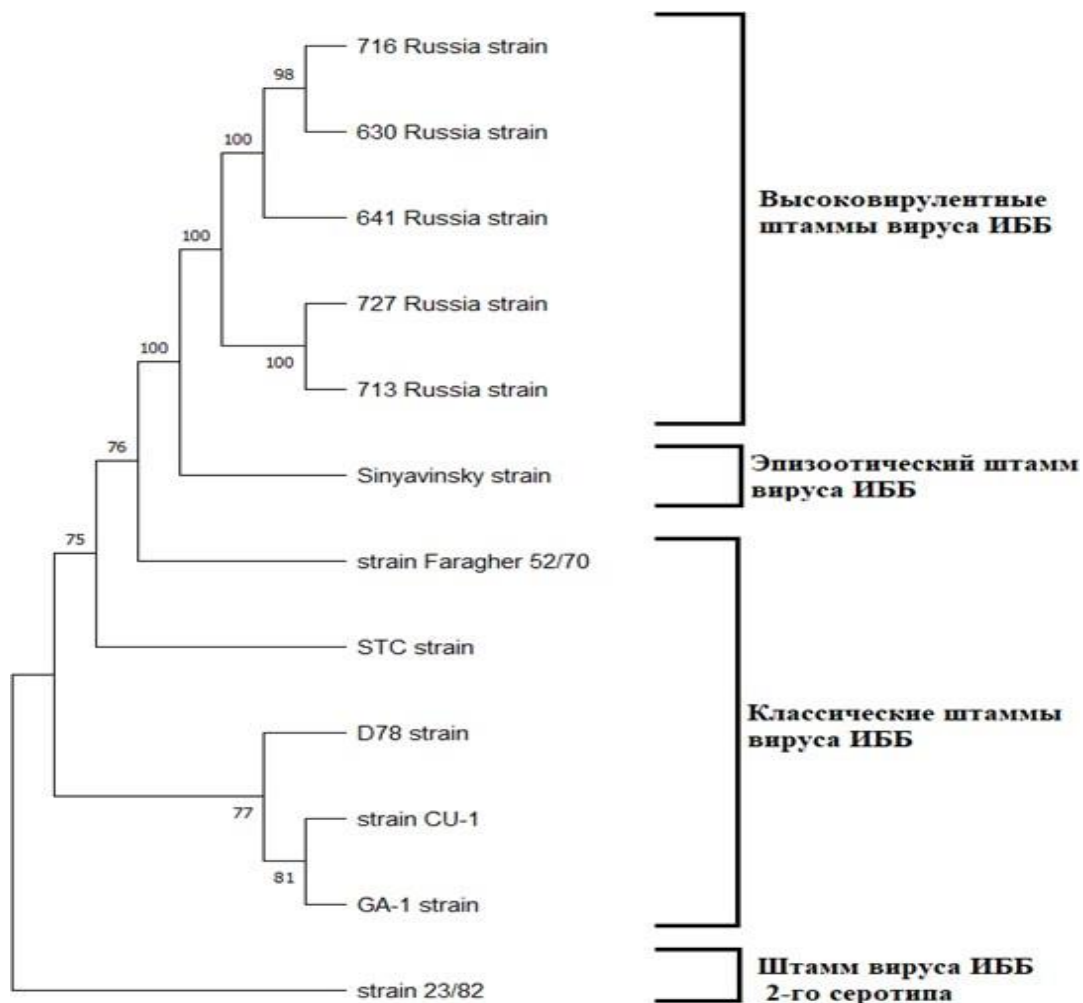


Рисунок 4 - Дендрогамма изученных штаммов инфекционной бурсальной болезни, построенная методом «Neighbor-Joining» с использованием программы MEGA 11.

Нужные фрагменты очищали с помощью электрофореза и лигировали. Лигазной смесью трансформировали клетки бактерий *E. coli* и отбирали трансформантов на среде LB с зеоцином. Плазмида pICZ α -VP2 (Рис. 5) была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР с парами праймеров VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R, а также с помощью рестрикционного анализа.

На рисунке 5 видно, что плазмида содержит фрагмент гена VP2 (V2-His) в единой рамке считывание с последовательностью сигнала секреции aMF, а также с-тус эпитопом и бх гистидиновой меткой. Также отмечены pUC origin – бактериальный ориджин репликации, ZeoR - ген устойчивости к антибиотику зеоцину, AOX1 promoter - промотора гена алкогольоксидазы дрожжей *P. pastoris* AOX1. Как уже было сказано ранее плазмида pICZ α -VP2 была проверена на наличие вставки с помощью ПЦР. Результат ПЦР-реакции представлен на рисунке 6.

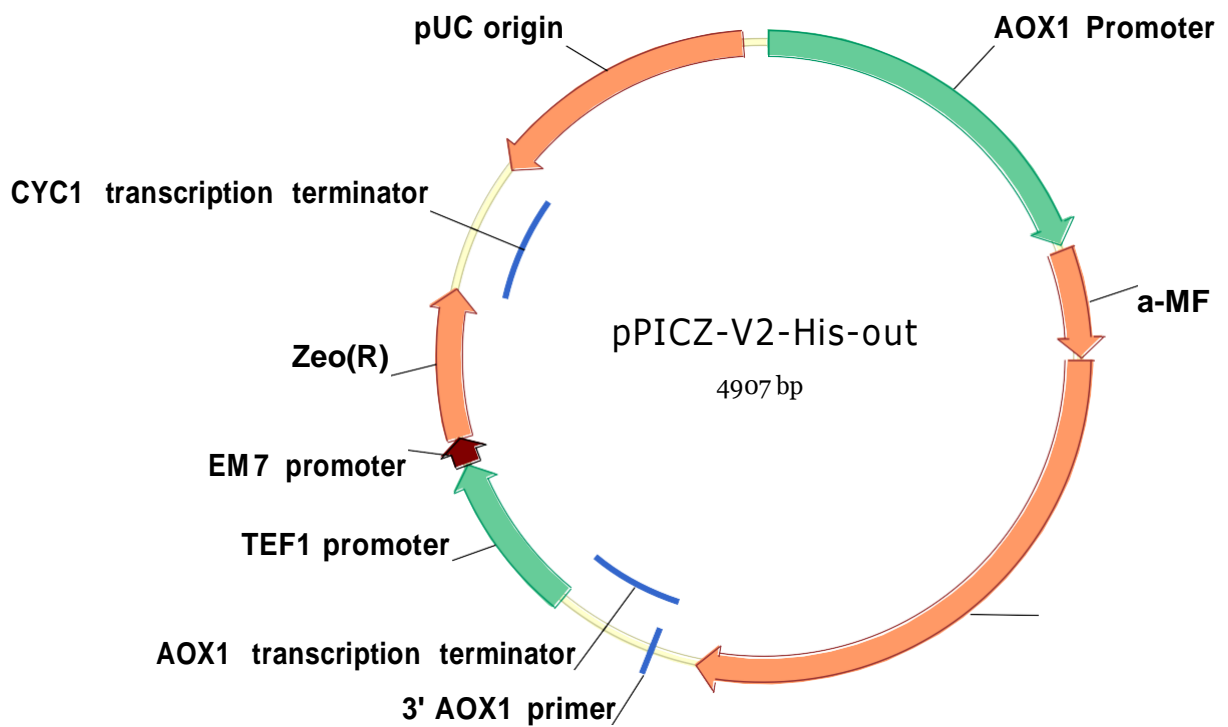


Рисунок 5 - Карта плазмиды pPICZ α -VP2.

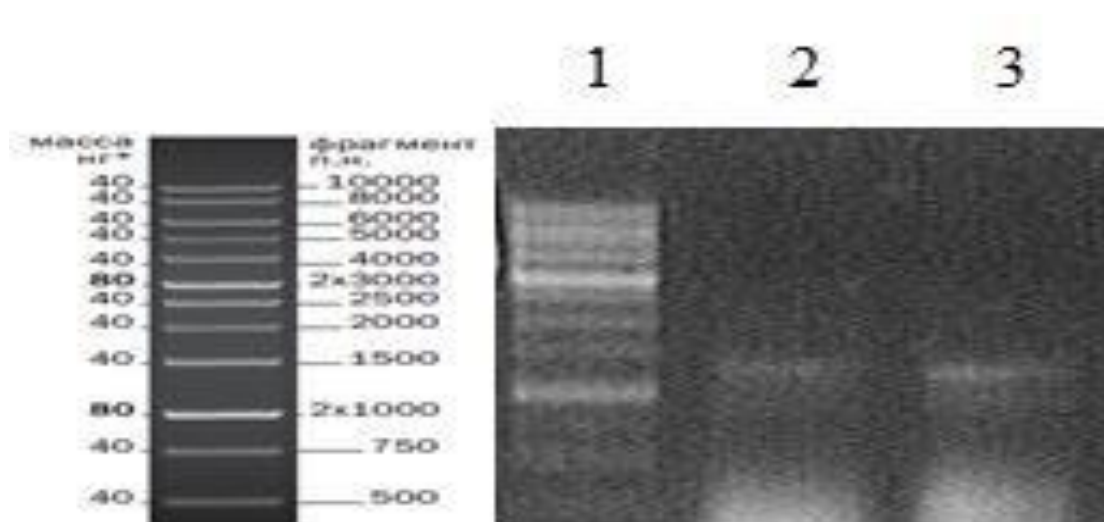


Рисунок 6 - Электрофореграмма результатов ПЦР-реакции с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

Размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.). На рисунке 6 изображены результаты электрофореграммы pPICZ α -VP2 с праймерами VP2-EcoRI-F и VP2-XbaI-R, сверху обозначены номера дорожек:

Дорожка №1- Ladder 1 kВ (Евроген, Россия)

Дорожка №2- результаты ПЦР по плазмиде рPICZ α -VP2 (клон№1)

Дорожка №3- результаты ПЦР по плазмиде рPICZ α -VP2 (клон№2)

Как и на рисунке 2 также отмечается свечение фрагментов в районе 1300 пар нуклеотидов, что соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.).

2.2.2. Получение штамма дрожжей *P. pastoris*, синтезирующего белок VP2

Для интеграции плазмиды рPICZ α -VP2 в геном дрожжей *P. pastoris* плазмиду рPICZ α -VP2 линеаризовали с помощью рестриктазы PmeI. Получившимся линейным фрагментом трансформировали штамм *P. pastoris* GS115 методом электропорации. Отбор трансформантов проводился на среде YEPDS с зеонином.

Наличие необходимой интеграции в хромосомной ДНК штамма, трансформированного плазмидой рPICZ α -VP2, проверяли с помощью ПЦР с парой праймеров VP2-EcoRI-F – VP2-XbaI-R. В качестве матрицы использовали геномную ДНК полученных трансформантов. Результаты ПЦР анализа приведены на рисунке 7.

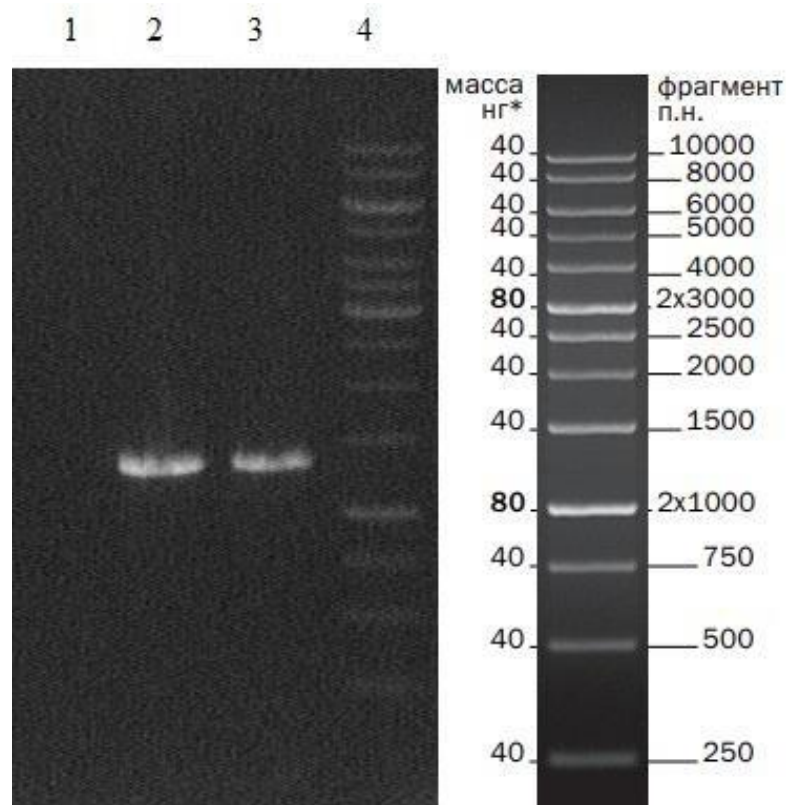


Рисунок 7 - Электрофореграмма результатов ПЦР-реакции с праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R.

На рисунке 7 изображена электрофореграмма результатов ПЦР-реакции плазмиды pICZ α -VP2 праймерами VP2- EcoRI-F и VP2-XbaI-R, сверху обозначены номера дорожек:

Дорожка №1- отрицательный контроль

Дорожка №2- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон№1)

Дорожка №3- геномная ДНК штамма VP2-GS115 в качестве матрицы (клон№2)

Дорожка №4- Ladder 1 кВ (Евроген, Россия)

Также, как и на рисунке 2 и 6 размер полученных фрагментов соответствует теоретически ожидаемому (1339 п.н.).

Таким образом, был получен штамм VP2-GS115 дрожжей *P. pastoris*, содержащий каскету экспрессии с геном VP2. В этой каскете кодирующая последовательность VP2 находится в единой рамке считывания с последовательностями альфа-фактора, с-тус-эпитопа и бх гистидиновой метки. Транскрипция этой каскеты обеспечивается за счёт работы промотора гена АОХ1, индуцируемого в средах с метанолом. Добавленная к белку последовательность альфа-фактора обеспечивает выделение белка клетками дрожжей в среду и будет удалена в процессе секреции. Последовательность с-тус-эпитопа позволит эффективно анализировать синтез белка с помощью Вестерн-блот гибридизации.

2.2.3. Синтеза белка VP2 в дрожжах *P. pastoris*

Для индукции синтеза рекомбинантного белка полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMGY в течение 72 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMMY с метанолом на 72 часа для индукции промотора АОХ1. Далее среду отделяли от клеток и концентрировали. Пробы наносили на градиентный ПААГ, проводили электрофоретическое разделение белков и их перенос на нитроцеллюлозную мембрану с последующей обработкой антителами. Результаты электрофореза и вестерн-блот гибридизации приведены на Рис. 8.

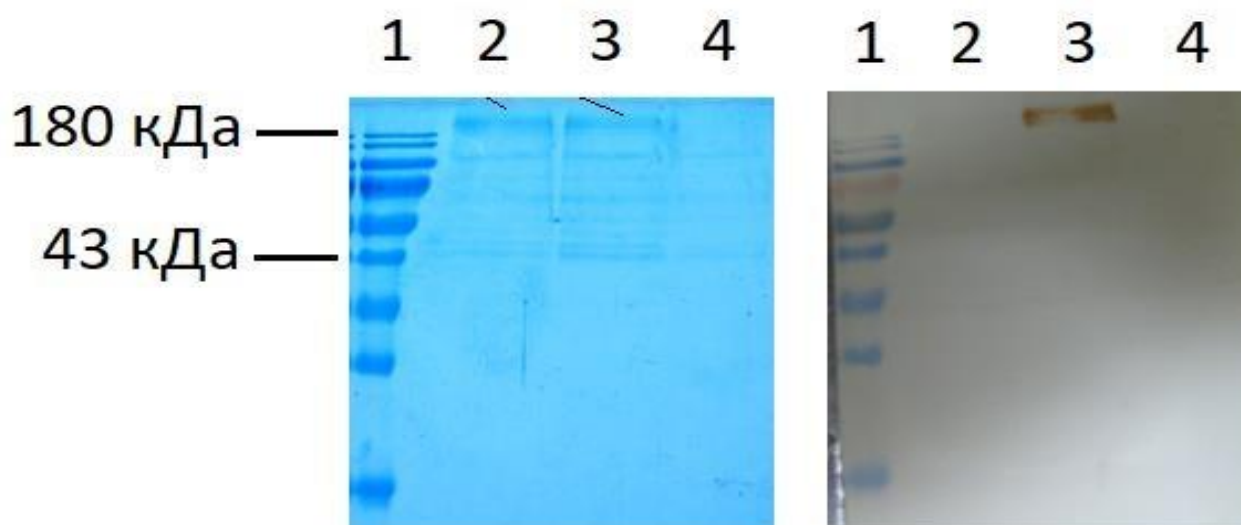


Рисунок 8 - Электрофореграмма (слева) и вестерн-блотинг

(справа) секреторных белков.

На рисунке 8 изображены электрофореграмма (слева) и вестерн-блотинг (справа) секреторных белков, сверху обозначены номера дорожек:

Дорожка №1- Маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Дорожка №3 - Средаот штамма VP2-GS115 выделяющего секреторный белок с VP2 с-трус эпитопом и 6xHis-меткой

Дорожка №4 Среда от штамма X-33, не синтезирующего рекомбинантных белков.

Секреторный белок синтезировался и секретировался. Но было отмечено, что он весь агрегировал и на электрофорезе проходит в области выше 180 кДа. В ожидаемом диапазоне 40 кДа, соответствующей ожидаемому размеру мономерного белка VP2, ничего не выявлялось при использовании вестерн-блот гибридации.

Как было далее выявлено, агрегация белка VP2 связана с кипячением проб в присутствии SDS, которое проводили перед электрофорезом. Если этот этап опустить, то можно увидеть, что в исходной культуральной среде белок VP2 либо находится в виде мономера, либо представляет собой агрегаты гораздо большего размера (Рис. 9).

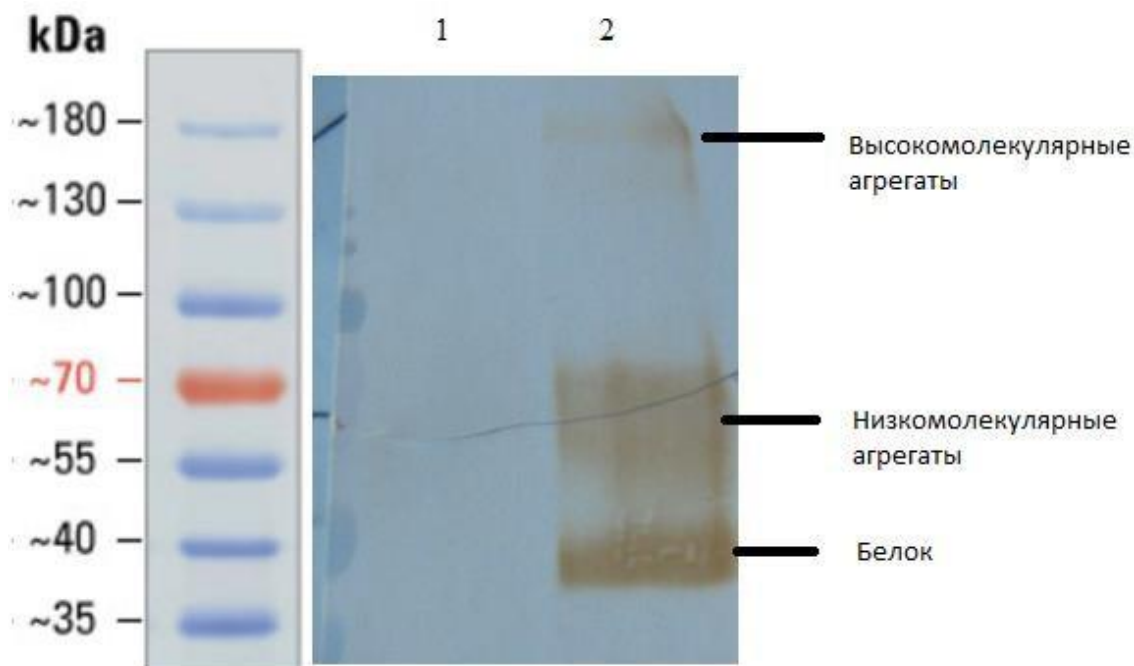


Рисунок 9 - Вестерн-блотинг секреторных белков

Как видно из рисунка 9 на нитроцеллюлозной бумаге белок VP2 проходит в области 40, 70 и 180 кДа, что говорит о том, что в исходной культуральной среде он присутствует не только в виде мономера. Сверху для удобства обозначены номера дорожек:

-
-
-

- Дорожка №1- Среда от штамма X-33, не синтезирующего рекомбинантных белков.

- Дорожка №2 - Среда от штамма VP2-GS115 выделяющего секреторный белок с VP2 с-мус эпитопом и бхHis-меткой.

Слева от нитроцеллюлозной мембраны представлен маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, США)

Полученный штамм VP2-GS115 культивировали в среде BMDM в течение 48 часов, после чего центрифугировали и переносили клетки в среду BMDM на 72 часа для индукции промотора гена AOX1 и синтеза рекомбинантного белка. Клетки центрифугировали, после чего отбирали среду, содержащую секретированный белок. Среду концентрировали и использовали для последующей иммунизации.

2.2.4. Изучение антигенных свойств рекомбинантной вакцины.

Для исследования антигенных свойств рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни вакцинировали цыплят яичного направления на 14-е сутки и оценивали серологические показатели крови у суточных, 14 дневных и 40 дневных цыплят.

Для определения уровня поствакцинального иммунитета проводили иммуноферментный анализ сыворотки крови с использованием набора «IDEXX» и «ID-Vet».

Как видно в таблице 1 уровень материнских антител у суточных цыплят был не достаточно высок, поэтому на 14 сутки можно было увидеть невысокие титры антител.

Считается, что на выработку иммунитета на вакцину приходится около 3 недель, поэтому контрольной забор крови был проведен в 40 день.

Таблица 1 - Определение антигенной активности рекомбинантной вакцины против ИББ у цыплят кросса Ломан Браун методом ИФА (n=10) набором «IDEXX».

Номер Группы	Адьювант	Концентрация белка VP2, мкг	Путь введения	Объём препарата, мкл	Средний геометрический титр антител к VP2 в ИФА*		
					0 день	14 сут.	40 сут.
1	ГОА	1 мкг/мл	П/к	100	5806±250	211±10	657±20
2	ГОА	0,2 мкг/мл	П/к	100	5272±200	136±10	230±10
3	ГОА	0,04 мкг/мл	П/к	100	5790±250	153±10	186±10
4	-	-	-	-	6482±270	243±10	58±5

Примечание: * - Обратные значения титров антител в ИФА, (P<0,05)

По результатам проведенных исследований можно сказать, что иммунитет образовался только у группы №1, так как произошло увеличение титра антител при коэффициенте вариации 12,5%. В группе №2 и №3 иммунитет остался на уровне 14 дня, возможно, это связано с маленьким количеством рекомбинантного белка в вакцине. В контрольной группе титры антител почти полностью отсутствовали.

Для того чтобы поставить более чувствительный ИФА на рекомбинантный белок VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни был приобретён набор производства ID-Vet (ID Screen IBD VP2) и повторно проведен анализ титров антител. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Определение антигенной активности рекомбинантной вакцины против ИББ у цыплят кросса Ломан Браун методом ИФА (n=10) набором «ID-Vet».

Номер Группы	Адьювант	Концентрация белка VP2,мкг	Путь введения	Объём препарата, мкл	Средний геометрический титр антител к VP2 в ИФА*		
					0 день	14 сут.	40 сут.
1	ГОА	1 мкг/мл	П/к	100	5515±230	167±10	1664±100
2	ГОА	0,2 мкг/мл	П/к	100	5153±210	158±10	560±20
3	ГОА	0,04 мкг/мл	П/к	100	5320±230	169±10	315±15
4	-	-	-	-	5990±250	210±10	63±5

Примечание: * - Обратные значения титров антител в ИФА, (P<0,05)

Как видно в таблице 2 титры антител у группы №1 в 40 день значительно выше, чем на 14, что говорит об иммунном ответе на рекомбинантный белок VP2. У группы № 2 и 3 также видно увеличение титров антител по сравнению с данными из таблицы 1, но более стойкий иммунитет наблюдался у группы №1 при концентрации рекомбинантного белка 1 мкг/мл.

В результате проведения серологического исследования сывороток крови цыплят, привитых рекомбинантной вакциной против ИББ в возрасте 14 суток объёмом 0,1 см³ было установлено, что наиболее высокий уровень антител имеют цыплята первой группы. Уровень антител у цыплят в суточном возрасте достигал 1:5153 - 1:5990.

Полученные данные свидетельствуют о том, что рекомбинантная вакцина антигенно активна.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработана рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни, представляющая собой субстанцию, состоящую из рекомбинантного белка VP2, дрожжевой среды и адьюванта (ГОА), предназначенная для вакцинации цыплят промышленных кроссов.

2. Изучена нуклеотидная последовательность гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни штамма «Синявинский», который более близкородственен к высоковирулентным штаммам, выделенным на территории Российской Федерации и к классическому штамму «52/70» вируса ИББ.

3. Разработан алгоритм получения рекомбинантного белка VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни размером 40 кДа и синтезирован на дрожжах *Pichia pastoris*.

4. Подобраны праймеры для амплификации гена VP2 вируса инфекционной бурсальной болезни (прямой VP2- EcoRI -F и обратный VP2- XbaI-R):

VP2- EcoRI -F 5'- AgaattcATGACAAACCTGCAAGATCA-3'

VP2- XbaI-R 5'- AtctagaAATGCTCCTGCAATCTTTCAG -3'

5. Разработан алгоритм изготовления рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, заключающийся во встраивании плазмидной ДНК с участком нуклеотидной последовательности белка VP2 вируса ИББ в дрожжевые клетки *Pichia pastoris*, с последующим синтезом и очисткой его.

6. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни вызывает выработку вируснейтрализующих антител в организме цыплят кур-несушек через три недели после вакцинации (средний титр 1600 в иммуноферментном анализе).

7. Установлена концентрация белка в рекомбинантной вакцине против инфекционной бурсальной болезни, которая вызывает защитный иммунитет к ИББ у иммунизированных кур - 1 мкг/мл в объеме 0,1 см³.

8. Рекомбинантная вакцина против инфекционной бурсальной болезни не вызывает иммуносупрессию в бурсе Фабрициуса у цыплят кур-несушек и воспалительных реакций в месте введения пятикратной дозы препарата (0,5 см³) в течение 21 дня наблюдения.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Основные положения работы и ее практические результаты рекомендуется использовать в схеме лечебно-профилактических мероприятий птицеводческих хозяйств, а также для хозяйств, имеющих низкие показатели сохранности и продуктивности птицы.

Рекомендуем проведение производственных испытаний на птицефабриках с целью производства на территории Российской Федерации и импортозамещению существующих коммерческих вакцин.

Рекомендуем использовать рекомбинантный белок VP2 вируса ИББ для производства и разработки наборов ИФА на определение антител на векторные и рекомбинантные вакцины.

Рекомендуем для производства и применения рекомбинантных вакцин против инфекционной бурсальной болезни, на основе белка VP2, использовать штаммы, выделенные на территории Российской Федерации (эпизоотический штамм «Синявинский», 641_Russia, 716_Russia, 630_Russia, 727_Russia, 713_Russia) либо классический штамм «52/70».

Использовать технологию получения рекомбинантного белка VP2 вируса ИББ, включающую выделение нуклеотидной последовательности белка VP2 и встраивание в плазмиду, с последующей трансформацией дрожжевых клеток и синтеза его для производства вакцин нового поколения в промышленном птицеводстве.

5. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные данные позволяют в дальнейшем разработать нормативно-техническую документацию (НТД) для регистрации вакцины. Это позволит проводить широкие производственные испытания рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни, с последующим производством на биопредприятии и применением на птицефабриках.

Кроме того, использование рекомбинантных белков вируса ИББ, которые не присутствуют в векторных или рекомбинантных вакцинах (например, использование антигена VP3 в ИФА), позволило бы реализовать стратегию DIVA.

Перспективным является также разработка и изучение рекомбинантных вакцин против других вирусных и бактериальных болезней сельскохозяйственной птицы (нюкаслской болезни, инфекционного бронхита кур, синдрома снижения яйценоскости и прочих).

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. Веретенников В.В. Секвенирование нуклеотидной последовательности гена VP2 эпизоотического штамма вируса инфекционной бурсальной болезни и сравнение её с классическими и высококовирулентными штаммами / В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов, Н.В. Тарлавин [и др.] // Международный вестник ветеринарии. – 2022. – № 1. – С. 36-41. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.1.36

2. Веретенников В.В. Использование рекомбинантного белка VP2 в качестве субъединичной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов, А.М. Румянцев, Н.В. Тарлавин //

Статьи, опубликованные в сборниках материалов конференций:

1. **Веретенников В. В.** Применение рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Материалы национальной научной конференции профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов СПбГУВМ, Санкт-Петербург, 25–29 января 2021 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 24-25.

2. **Веретенников В. В.** Особенности разработки рекомбинантной вакцины против инфекционной бурсальной болезни / Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // Мировое и российское птицеводство: состояние, динамика развития, инновационные перспективы : Материалы XX Международной конференции, Сергиев Посад, 08–10 октября 2020 года / Российское отделение Всемирной научной ассоциации по птицеводству, НП "Научный центр по птицеводству". – Сергиев Посад: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства, 2020. – С. 609-610.

3. Красков Д.А. Патанатомические изменения в фабрициевой сумке цыплят, зараженных штаммом 52/70 вируса болезни Гамборо / Д.А. Красков, **В.В. Веретенников**, Н.В. Тарлавин // Материалы X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», посвященной году науки и технологий, Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 173-174.

4. **Веретенников В. В.** Функциональная активность иммунной системы птицы / Э. Д. Джавадов, В. В. Веретенников, Н. В. Тарлавин // СФЕРА: Технологии. Корма. Ветеринария. – 2020. – № 2(12). – С. 40-44.

5. Тарлавин Н.В. Экспрессия гена PTSG-2 в тканях фабрициевой сумке цыплят-бройлеров при вакцинации иммунокомплексной вакциной из штамма «ВНИВИП» / Н.В. Тарлавин, Д.А. Красков, **В.В. Веретенников**, О.В. Козыренко, А.О. Беликова // Материалы X юбилейной международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны», посвященной году науки и технологий, Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2021. – С. 173-174.

6. **Веретенников В. В.** Идентификация вируса инфекционной бурсальной болезни методом диффузной преципитации / В. В. Веретенников // Материалы 73-й международной научной конференции молодых ученых и студентов СПбГАВМ, Санкт-Петербург, 08–17 апреля 2019 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2019. – С. 47-48.