

Министерство образования и науки Кыргызской Республики

**Кыргызский национальный аграрный университет
имени К.И. Скрябина**

Диссертационный совет Д_____

На правах рукописи
УДК 578.824.11:615.371:57.083.2

ЖИЛИН ЕВГЕНИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ**

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

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

БИШКЕК – 2014

Диссертационная работа выполнена в РГП «Научно-исследовательском институте проблем биологической безопасности» КНМОН Республики Казахстан, Кыргызском научно-исследовательском институте ветеринарии имени Арстанбека Дуйшеева

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

Акматова Эльмира Казакбаевна

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «» 2014 г. в 00⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д. при Кыргызском национальном аграрном университете имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О.Медерова, 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызского национального аграрного университета имени К.И. Скрябина по адресу: 720005, г. Бишкек, ул. О.Медерова, 68.

Автореферат разослан «____» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат ветеринарных наук

Крутская Е.Д.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Бешенство является одной из древнейших и опасных инфекционных болезней. Восприимчивость к заболеванию отмечена у всех видов животных и человека, что определяет её социально и экономическую значимость.

Анализ данных характеризующих эпизоотологическую ситуацию по бешенству в Республиках Казахстан и Кыргызстан, а также сопредельных государствах за последние годы, свидетельствует о наличии тенденции к ее усугублению. Основным резервуаром и главным источником бешенства на территории Казахстана и Кыргызстана являются дикие плотоядные, в первую очередь лисицы и корсаки. Являясь основным вектором распространения заболевания, они непосредственно или через собак и кошек могут заражать бешенством домашних продуктивных животных и человека. Повышенный показатель плотности популяции дикой фауны в отдельных регионах республик свидетельствует об отсутствии должного контроля за численностью животных, что способствует активности и нарастанию тенденции к расширению природных очагов на новые территории и делает актуальным задачу ликвидации бешенства именно среди диких плотоядных животных.

Международный опыт свидетельствует о невозможности искоренения заболевания без ликвидации очагов этой инфекции в популяциях лис и других плотоядных животных. Среди известных методов, оральная вакцинация против бешенства, является единственным эффективным методом профилактики заболевания не нарушающим естественных механизмов регуляции диких плотоядных животных. Оральная вакцинация продемонстрировала свою эффективность во многих странах западной Европы и была принята как основной метод профилактики в очагах инфекции, позволяющий ликвидировать болезнь даже в тех регионах, где количество диких плотоядных постоянно увеличивается.

До настоящего времени потребность в антирабических препаратах восполняется импортными вакцинами. Несмотря на доказанную эффективность, препараты импортного производства не лишены недостатков, связанных с необходимостью соблюдения «холодовой цепи» (минусовых температур), низкой иммуногенностью вакцин, а также потенциальной опасностью векторов рекомбинантных вирусов входящих в состав вакцин.

Вышеуказанные аспекты, а также отсутствие отечественных разработок задерживают внедрение этого эффективного метода борьбы с бешенством диких плотоядных и эрадикации инфекции на территории республик, что делает актуальной проблему разработки антирабической вакцины для орального применения.

Перечисленные проблемы являются актуальными и послужили основой для проведения работ по созданию и испытанию культуральной антирабической вакцины для орального применения.

Связь задач диссертационной работы с научными программами и научно-исследовательскими работами. Работа выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательских работ по теме «Разработка культуральной пероральной вакцины против бешенства животных», на 2000-2005 гг. в НИИПББ и по теме «Эпизоотологический мониторинг бешенства животных и разработка мер предупреждения» на 2009-2013 гг. в КНИИВ.

Цель и задачи исследований.

Цель работы заключалась в разработке пероральной вакцины для профилактики бешенства среди диких плотоядных животных.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести адаптацию тканевого фиксированного вируса бешенства к репродукции в культурах клеток;
- изучить иммунобиологические свойства культурального вируса бешенства;
- разработать технологию получения антирабической вакцины для иммунизации диких животных с заданными свойствами;
- изучить иммунобиологические свойства вакцины, изготовленной из культурального вируса бешенства;
- подготовить методические рекомендации и НТД на приготовление антирабической вакцины для перорального применения

Научная новизна работы.

- получен культуральный штамм вируса бешенства штамма VRC-RZ2;
- подобраны оптимальная система и условия культивирования вируса бешенства штамма VRC-RZ2;
- проверена безопасность культурального штамма вируса бешенства для животных;
- разработана технология изготовления пероральной антирабической вакцины из культурального штамма VRC-RZ2 для иммунизации животных;
- изучены иммунобиологические свойства вирусвакцины из культурального штамма вируса бешенства штамма VRC-RZ2.

Практическая значимость полученных результатов. Пероральная антирабическая вакцина после регистрационных испытаний будет рекомендована к плановому использованию с профилактической целью и вынужденно в угрожаемой зоне, а также в неблагополучных пунктах для иммунизации диких и бродячих плотоядных животных против бешенства.

На основании полученных результатов исследований разработаны следующие нормативно-технические документы: Вакцина пероральная против бешенства животных [СТ 405-1919-04 ГП-073-2012], временная инструкция по изготовлению и контролю, временное наставление по применению.

Экономическая значимость полученных результатов. Результаты диссертации могут быть использованы в качестве коммерческого конкурентоспособного препарата для профилактики рабической инфекции среди диких плотоядных животных, что позволит отказаться от импорта дорогостоящих зарубежных пероральных вакцин против бешенства.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- иммунобиологические свойства культурального штамма VRC-RZ2 вируса бешенства;
- технология получения антирабической вакцины из штамма VRC-RZ2 для пероральной иммунизации животных;
- иммунобиологические свойства вакцины из штамма VRC-RZ2 вируса бешенства

Личный вклад соискателя Экспериментальные исследования и обобщение результатов по теме диссертации выполнены автором самостоятельно.

Апробация результатов исследований. Основные положения диссертации доложены на: Международной конференции «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний», Россия, Новосибирск, 2004; Международной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы современной биологии», Казахстан, Казахстан, Алматы, 2006; Международной конференции «Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных», Россия, Ульяновск, 2006; Международной конференции «Биотехнология в Казахстане: Проблемы и перспективы инновационного развития», Казахстан, Алматы, 2008.

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 1 патент, разработано -1НТД.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 148 листах компьютерного текста. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических предложений, приложений, иллюстрирована 25 таблицами, 13 рисунками. Список использованной литературы включает 185 источников. В приложении представлены копии документов, подтверждающие достоверность проведенных исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, необходимость разработки отечественной вакцины и получении отечественного производственного штамма вируса репродуцирующего в культурах клеток.

В главе 1 «Обзор литературы» по материалам отечественных и зарубежных публикаций дается характеристика биологических свойств возбудителя бешенства, результаты анализа эпизоотической ситуации по заболеванию в Казахстане и Кыргызстане, а также сопредельных государствах. Приведена характеристика способов адаптации вируса бешенства к репродукции в культурах клеток, пероральных антирабических вакцин и технологий их изготовления, а также методов контроля качества и оценки эффективности препаратов.

В главе 2 «Материалы и методы исследований» дана характеристика объектов исследований и методических подходов к выполнению исследований. Работа выполнялась в лаборатории технологий готовых форм биопрепаратов РГП НИИПББ КН МОН РК и лаборатории вирусологии и биотехнологии КНИИВ им. А. Дуйшеева в период 2005-2013 гг.

В работе использовались штаммы вируса бешенства: «Овечий», «МПТ-НИСХИ», «VRC-RZ2», «CVS». Культуры клеток: первично-трипсинизированные - КФ, ПЯ, перевиваемые - ВНК-21, ПС, МДСК, МДВК, L-929, РК, ПК, ТТ, CV, Vero, ППК, ПЩ, Нер-2.

Биологические свойства штамма и опытные образцы вакцины испытывались на беспородных белых мышах, крысах, беспородных щенках собак, кроликах, овцах.

Методы.

Культивирование вируса в культуре клеток. Культивирование вируса проводили в стационарном и роллерном монослое клеток ВНК-21, ПС.

Определение биологической активности вируса. Биологическую активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток (ВНК-21) и на новорожденных мышах. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча, выражали в тканевых цитопатических дозах ТЦД₅₀/см³ и мышинных летальных дозах МЛД₅₀/см³.

Определение безвредности вакцины. Метод определения безвредности вакцины заключался в скармливании 10-кратной дозы животным. Вакцину считали безвредной, если животные выжили и не показали никаких признаков заболевания.

Иммуногенность вакцины. Иммуногенность вакцины оценивали по способности индуцировать выработку вируснейтрализующих антител и защите животных при контрольном заражении штаммом «CVS» вируса бешенства.

Определение титра вируснейтрализующих антител в сыворотке крови. Метод основан на нейтрализации постоянной дозы вируса штамма CVS (30-300 МЛД₅₀) рядом последовательных разведений исследуемой сыворотки. Двукратные разведения сыворотки смешивали с равным объемом вируса штамма CVS. Полученную смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 1,5 часов и вводили интрацеребрально мышам. Подсчет титра вируснейтрализующих антител проводили по методу Рида и Менча.

Метод флуоресцирующих антител. Методом флуоресцирующих антител (МФА) исследовали инфицированные культуры клеток ВНК-21 и ПС, мазки отпечатки из различных отделов мозга инфицированных животных. Препараты высушивали на воздухе и фиксировали в охлажденном ацетоне. Наносили на препарат диагностический антирабический флуоресцирующий иммуноглобулин. Предметные стекла с препаратом промывали и высушивали на воздухе. Подготовленные препараты просматривали под люминесцентным микроскопом с иммерсионной системой.

Метод биологической пробы. Для заражения животных использовали надосадки мозговых и культуральных суспензий вируса. Мышей заражали

интрацеребрально. При оценке результатов учитывали проявление клинических признаков у зараженных мышей.

Статистическая обработка результатов исследований. Математическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel-2010. Достоверность результатов оценивали с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В главе 3 «Результаты собственных исследований и их обсуждение» представлены результаты адаптации вируса бешенства к репродукции в культуре клеток, изучения иммунобиологических свойств культурального вируса, разработки технологии изготовления вакцин для перорального применения и изучению иммунобиологических свойств препарата, а также анализ результатов проведенных исследований.

Адаптация вируса-фикс бешенства к репродукции в культурах клеток

Выбор клеточных субстратов при проведении наших исследований обуславливался литературными данными, технологичностью клеточных систем, а также наличием культур клеток в коллекции НИППББ.С целью адаптации вируса бешенства (ВБ) к клеточной системе были исследованы линии клеток МДСК, ВНК-21, ПЯ.

При проведении прямого заражения МДСК, ВНК-21 и ПЯ вирусом бешенства штаммов МПТ-НИСХИ, Овечий, CVS с использованием заражения, как во взвесь, так и в монослой клеток, а также с обработкой монослоя клеток ДЕАЕ-декстраном наличия цитапатических изменений клеток в течение 3 последовательных пассажей не отмечали. Отсутствие накопления вируса в каждом пассажном уровне было подтверждено результатами биологической пробы на мышах, методом флуоресцирующих антител (МФА) и электронной микроскопией (ЭМ).

В связи с отрицательными результатами при проведении прямого заражения культур клеток была испытана схема предполагающая адаптацию вируса к мозгу мышей и проведение перемежающихся пассажей на культуре клеток и мышах. Согласно данной схеме проводили интрацеребральное заражение мышей-сосунов. Из мозга павших мышей готовили суспензию на физиологическом растворе, осветляли и заражали ей следующую партию мышей, таким образом, было проведено 5 пассажей.

Все подопытные мыши, вне зависимости от штамма вируса, заболели на 4-6 сутки после заражения и болели с признаками паралитической формы бешенства. При исследовании МФА во всех отпечатках мозга зараженных мышей вне зависимости от штамма ВБ обнаружено специфическое свечение изумрудно-зеленого цвета гранул различного размера. Подобного свечения в препаратах мозга здоровых мышей не наблюдалось.

Препараты из суспензий мозга пятого пассажного уровня каждого штамма были исследованы электронной микроскопией. Во всех пробах были обнаружены вирионы пулевидной формы в виде отдельных частиц и

скоплений, морфологически соответствующие вирионам вируса бешенства. Титр мозговых суспензий 5 пассажа составил для штамма МПТ-НИСХИ - $5,83 \pm 0,171 \text{g МЛД}_{50}/0,03 \text{ см}^3$, Овечий - $5,25 \pm 0,251 \text{g МЛД}_{50}/0,03 \text{ см}^3$, CVS-4,75 $\pm 0,251 \text{g МЛД}_{50}/0,03 \text{ см}^3$

Для адаптации тканевого вируса-фикс бешенства (пассированного через мозг мышей) к репродукции в культуре клеток проводили по 2 последовательных пассажа в ВНК-21, МДСК, ПЯ каждого штамма вируса. В процессе проведения 2 последовательных пассажей в ВНК-21, МДСК, ПЯ каких-либо изменений в культурах клеток не отмечали.

При интрацеребральном инфицировании мышей суспензиями, полученными в результате пассирования вируса бешенства штаммов Овечий, CVS в ВНК-21, МДСК, ПЯ заболевания и каких-либо клинических отклонений у мышей не отмечали. Также отсутствовали клинические симптомы у мышей, инфицированных суспензией, полученной при пассировании вируса бешенства штамма МПТ-НИСХИ в культуре клеток ПЯ.

Заражение мышей культуральными суспензиями, полученными при пассировании вируса бешенства штамма МПТ-НИСХИ в ВНК-21, МДСК сопровождалось гибелью мышей с симптомами параличей.

В результате исследований с использованием МФА, в отпечатках мозга мышей инфицированных культуральной суспензией полученной в ВНК-21, МДСК обнаружены флуоресцирующие комплексы различной величины, подтверждающие наличие антигена вируса бешенства. При исследовании обеих проб суспензий мозга павших мышей ЭМ вирионов вируса бешенства не обнаружено, что может быть связано с низким уровнем его накопления.

Суспензиями мозга павших мышей были инфицированы ВНК-21 и МДСК. Проведены семь последовательных пассажей на данных культурах клеток.

В культуре клеток ВНК-21, инокулированной 10%-ной суспензией мозга мышцы (после 2-го последовательного пассажа), на 4 сутки культивирования наблюдали деструкцию монослоя и дегенерацию клеток, тогда как в контрольных (не инфицированных) культурах таких изменений не было. Деструктивные изменения, не сопровождались лизисом клеток, а на фоне сохранившегося монослоя, наблюдалась тенденция к специфической агрегации клеток с небольшим разрежением монослоя, а также появлением отдельных светопреломляющих клеток округлой формы. Поражение клеток, проявившееся на 2-м пассаже с 4 суток культивирования, с увеличением пассажного уровня проявлялось все в более ранние сроки. Проявление цитопатического действия (ЦПД) вируса начиналось на 2 сут. после инфицирования культур, а на 4-5 сут. поражение клеток достигало уже 80% (6-7 пассаж) (рис. 3.4).

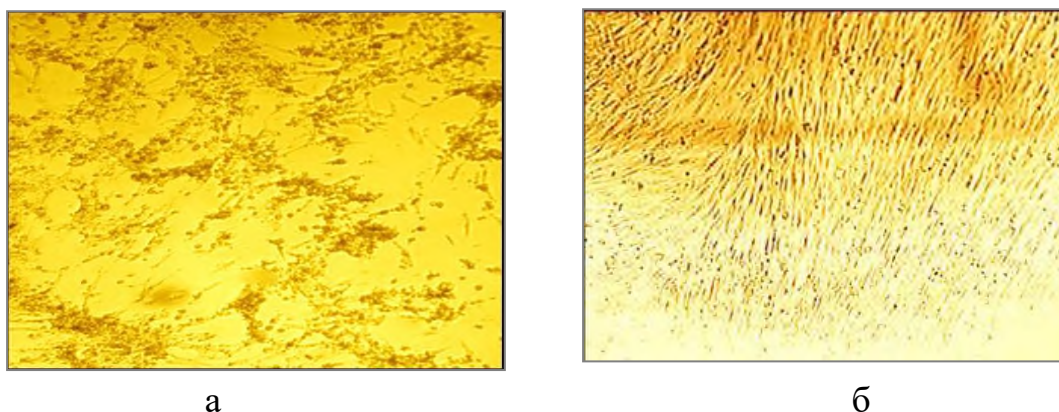


Рис. 1. Результаты микроскопии ВНК-21,5 сутинкубирования

Примечание: а – цитопатическое действие вируса в инфицированной культуре клеток, б – отсутствие каких либо изменений в интактной культуре клеток

В МДСК на 3-4 последовательном пассаже, на 4-е сут после инфицирования, также были обнаружены дегенерационные изменения клеточного монослоя в виде «озер», по краям которых находились крупные клетки, отличающиеся светопреломлением и величиной от остальных клеток, аналогичных изменений в контролях не отмечалось. Следует отметить, что в последующих пассажах подобных изменений клеток не обнаружено.

В результате исследований МФА во всех исследуемых препаратах, полученных из инфицированной ВНК-21, были выявлены флуоресцирующие гранулы. Во всех препаратах, полученных из инфицированной МДСК, а также в контрольных препаратах специфической флуоресценции не обнаружено.

При электронно-микроскопическом исследовании препаратов вирусосодержащей культуральной суспензии 7, 10-го пассажного уровня, полученной в ВНК-21, были обнаружены вирусные частицы пулевидной и овальной формы, морфологически соответствующие вирионам вируса бешенства.

Учитывая полученные результаты культуральный вариант ВБ седьмого пассажного уровня был лиофилизирован и депонирован в коллекции микроорганизмов НИИПББ с названием VRC-RZ2.

Изучение иммунобиологических свойств культурального вируса бешенства. Изучение культуральных свойств вируса бешенства

Для выбора оптимальной чувствительной клеточной системы и получения максимального количества вируса бешенства изучена возможность репродукции ВБ штамм VRC-RZ2 в культурах клеток (табл. 1).

Таблица 1– Результаты определения чувствительности культур клеток к вирусу бешенства представлены в таблице, n=3

Наименование культуры клеток	Пассажный уровень вируса	Период культивирования, сут	Площадь поражения клеточного монослоя, %	Титр вируса, lg МЛД ₅₀ /0,03 см ³
КФ	1-3	8-10	н/о	0,00
ПЯ	1-3	8-10	н/о	0,00

ПС	1-7	5-7	40-90	4,5-5,75
МДСК	1-3	8-10	н/о	0,00
L-929	1-3	8-10	н/о	0,00
РК	1-3	8-10	н/о	0,00
ПК	1-3	8-10	н/о	0,00
ТТ	1-3	8-10	н/о	0,00
ВНК-21	1-7	4-6	80-90	4,75-6,00
CV	1-3	8-10	н/о	0,00
Vero	1-3	8-10	н/о	0,00
ППК	1-3	8-10	н/о	0,00
ПЩ	1-3	8-10	н/о	0,00
Нер-2	1-3	8-10	н/о	0,00
МДВК	1-3	8-10	н/о	0,00

Результаты изучения культуральных свойств штамма ВБ показали, что из 15 испытанных линий клеток чувствительными к вирусу бешенства являются ПС и ВНК-21.

ЦПД в ПС отмечалось с первого пассажа на 4-е сутки культивирования, в виде округлых светопреломляющих клеток, образующих небольшие конгломераты от которых исходили тужи (Рис. 2). При дальнейшем культивировании время появления ЦПД количество очагов и их размеры увеличивались, на 5-6 сут наблюдалось отслоение пораженных клеток, небольшое разрежение монослоя, а также появление большого количества отдельных светопреломляющих клеток округлой формы. Титр вируса 5-го пассажного уровня в ПС составил $5,75 \lg \text{MLD}_{50}/0,03 \text{ см}^3$. Сокращение периода проявления ЦПД с увеличением пассажного уровня и возможность репродукции вируса бешенства в культуре клеток ПС может рассматриваться как хороший маркер адаптации.

ЦПД в ВНК-21 отмечалось на 2-е сут культивирования, но было менее выраженным. Наблюдалось округление клеток, некоторая разрозненность, сменяющаяся с увеличением срока культивирования агрегацией пораженных клеток с последующим отслоением от стекла агрегатов клеток. Титр вируса в суспензиях, полученных в ВНК-21, составлял $- 6,00 \lg \text{MLD}_{50}/0,03 \text{ см}^3$.

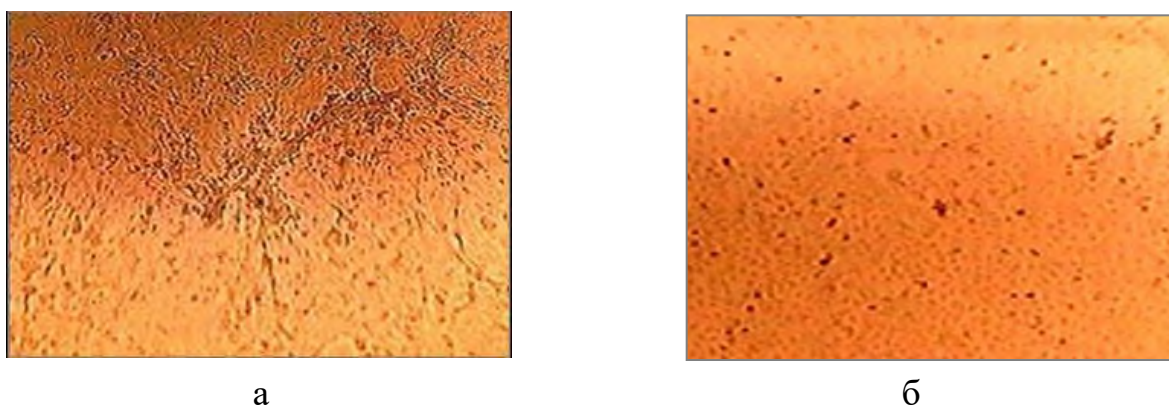


Рис. 2. Результаты микроскопии ПС, 5 сутинкубирования
Примечание: а - ЦПД ВБ в культуре клеток, б – интактная культура клеток

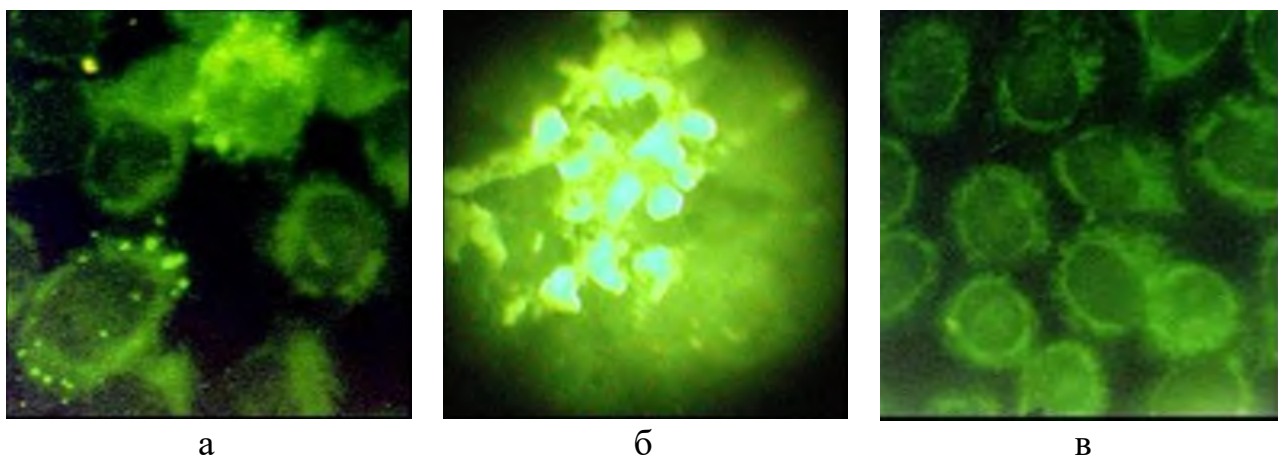


Рис.3. Результаты исследования МФА зараженной и интактной ПС
Примечание: а, б - специфическая флуоресценция антигена ВБ в инфицированной культуре клеток через 12 ч, 36 ч, соответственно (ув. 90×).

Для подтверждения специфичности ЦПД в инфицированных культурах клеток ПС в различные сроки инкубирования при помощи МФА выявляли антиген ВБ (Рис. 3).

Совпадение сроков образования «фокусов» флуоресценции и развития ЦПД, а также морфологическое сходство очагов ЦПД и флуоресцирующих конгломератов, свидетельствует о специфичности цитопатических изменений при культивировании ВБ штамм VRC-RZ2.

Исследование препаратов из вирусосодержащих суспензий, полученных в линиях клеток ПС, ВНК-21 электронной микроскопией показало наличие вирионов вируса бешенства.

Дальнейшее увеличение числа пассажей (до 15 пассажей) вируса в этих клеточных системах не приводило к значительному увеличению его инфекционной активности. Сравнительный анализ накопления вируса в культурах клеток ВНК-21 и ПС показал, что вирус бешенства штамм VRC-RZ2 накапливался в более высоких титрах в ВНК-21, в отличие от ПС. При этом, разница уровня накопления вируса в репродуктивных системах составляла 0,5-1,0 lg МЛД₅₀/см³.

В остальных испытанных культурах клеток проявление цитопатической активности ВБ в течение 3-х последовательных пассажей не обнаружено. При исследовании электронной микроскопией культуральных суспензий различных пассажей вирус бешенства также не обнаружен, а вирусный антиген не выявлен МФА.

ВБ штамм VRC-RZ2 наряду с хорошими адаптационными характеристиками и сравнительно высоким накоплением вируса в культурах клеток, размножается в ПС, ВНК-21 с проявлением цитопатогенного действия. В связи с тем, что определение инфекционной активности вируса бешенства титрованием на мышах занимает продолжительное время (21 сутки), требует большого количества экспериментальных животных, что значительно

повышает стоимость исследований, была изучена возможность использования ВНК-21 и ПС, для титрования штамма VRC-RZ2.

С этой целью вирусными суспензиями разных пассажных уровней в десятикратных разведениях были инфицированы ВНК-21, ПС и мыши. В результате проведения корреляционного анализа полученных данных были установлены линейные зависимости, которые составили ($r=0,97$) между инфекционной активностью вируса при титровании на мышах, ПС и ВНК-21. Результаты корреляционного анализа позволяют использовать метод титрования на культурах клеток для определения инфекционной активности вирусодержащей суспензии. Для соизмеримости результатов теста в культуре клеток с методом на мышах установлены расчетные поправочные коэффициенты. Расчетный поправочный коэффициент при титровании на ПС составил 1,0, а при определении инфекционной активности вируса в культурах клеток ВНК-21 составил 1,5.

Следует отметить, что при титровании вируса бешенства в ВНК-21 на 6-10 сутки наблюдалось появление неспецифической дегенерации как в инфицированных, так и в контрольных культурах клеток, по-видимому, связанной со старением клеток используемой культуральной линии. Описанные обстоятельства создавали затрудненность при считывании результатов. Поэтому в качестве тест-системы для определения инфекционной активности вируса бешенства была выбрана культура клеток ПС, лишенная аналогичных недостатков.

Изучение безопасности вируса бешенства штамма VRC-RZ2. Патогенность для животных

В связи с тем, что штамм вируса бешенства VRC-RZ2 планируется использовать в составе вакцины в живом виде, имелась необходимость изучения степени его патогенности для животных.

В результате экспериментов установлено, что вирус бешенства штамм VRC-RZ является патогенным при интрацеребральном введении для всех видов животных, но обладает меньшей патогенностью, чем штамм МПТ-НИСХИ для мышей, крыс, кроликов и собак при в/м, п/к и п/о методах заражения. Установлена полная апатогенность вируса бешенства штамма VRC-RZ2 для собак и овец при экстраневральных методах введения.

Индекс инвазивности

Одним из показателей вирулентности вируса является индекс инвазивности, который определяли по разнице между инфекционной активностью вируса оцененной при интрацеребральном титровании на мышах и титром, полученным при подкожном введении. Как показали опыты, индекс инвазивности штамма VRC-RZ находился в пределах 5,3 - 5,5, что позволяет отнести его к группе слабовирулентных штаммов.

Контроль реверсии к вирулентной форме

Использование любых штаммов вируса бешенства в изготовлении антирабических препаратов требует контроля реверсии слабопатогенных штаммов к первоначальной вирулентной форме. В связи с этим нами была изучена возможность реверсии вирулентных свойств вакцинного вируса

бешенства штамма VRC-RZ2. В результате проведенных исследований установлено, что пассирование вируса бешенства в мышечной и мозговой ткани кроликов не приводит к усилению нейровирулентности изучаемого штамма вируса бешенства. Установлено, что при внутримышечной инокуляции штамма VRC-RZ2 у животных на 8-12 день зафиксированы патогномичные симптомы паралитического бешенства (угнетение, нарушение координации движений, паралич). Активность изолированного из мозга вируса бешенства составляла $4,2 \pm 0,3 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$. При внутримышечной инокуляции суспензии инфицированного головного мозга (второй пассаж вирусосодержащего материала) зараженные животные не заболели. Аналогичные результаты получены при проведении последующих 2-х пассажей.

Спонтанная передача вируса

Следующий наш опыт заключался в определении возможности передачи вируса от зараженного к здоровому животному. С этой целью зараженные исследуемым штаммом ВБ и незараженные мыши были помещены в одну клетку. На 5-8 сут наблюдался падеж инфицированных мышей, во второй группе все мыши были живы.

Таким образом, представленные исследования показали, что полученный штамм VRC-RZ2 значительно снизил свою патогенность для лабораторных животных и относится к слабовирулентной группе. По совокупности оцененных признаков – сниженной нейропатогенности, индексу инвазивности, результатам по оценке реверсии и спонтанной передачи – штамм VRC-RZ2, соответствует требованиям, предъявляемым к вакцинным штаммам ВБ.

Изучение иммунобиологических характеристик штамма VRC-RZ2

Для определения иммуногенных свойств культурального вируса бешенства были иммунизированы мыши, щенки, МРС (овцы и козы).

Иммунизация мышей проводилась внутрибрюшинным введением вирусной суспензии с титром $5,75 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в разведениях 1:5, 1:10, 1:40 с последующим контрольным заражением через 14 суток ВБ штамм CVS с титром $4,75 \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$ подкожно в область верхней губы по $0,1 \text{см}^3$. В результате опыта было установлено, что после контрольного заражения в группе лабораторных животных, иммунизированной суспензией в разведении 1:5 выжило 100% мышей, 1:10 – 80%, 1:40 – 40%. Контрольные животные пали на 6 сутки с проявлением характерных клинических признаков бешенства.

Иммунизацию щенков проводили внутримышечно в область бедра при этом доза вируса составляла от 100 до $1000000 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Для контрольного заражения использовали ВБ штамм CVS в дозе 5000МЛД_{50} .

По результатам проведенных опытов было установлено, что иммунизация в дозе 300ТЦД_{50} и выше обеспечивает 100% защиту вне зависимости от способа введения. Контрольные, не вакцинированные животные и животные получившие дозу менее 300ТЦД_{50} пали на 5-6 сутки после интрацеребрального заражения. ВНА в сыворотках крови иммунизированных животных на 14 сутки после иммунизации обнаруживались в титре $1:16 \div 1:32$.

Для иммунизации МРС (козы, овцы), животным внутримышечно вводили вирусную суспензию в дозах от 100-100000 ТЦД_{50} . Через 14 суток после

вакцинации провели заражение всех животных, в том числе и интактных (не вакцинированных) интрацеребральным введением вирулентного ВБ в дозе 5000 МЛД₅₀/см³. Животные, вакцинированные в дозе 100 ТЦД₅₀ и не вакцинированные животные пали с клиникой характерной для бешенства. Доза 1000 ТЦД₅₀ предохраняла животных от заболевания бешенством в 50% случаев, а иммунизация в дозе 10000 ТЦД₅₀ обеспечивала 100% защиту.

Для определения иммуногенной активности при оральном введении вирусного антигена и изучения принципиальной возможности пероральной вакцинации против бешенства собакам (6-7 мес. возраста) на слизистую ротовой полости наносили вирусосодержащую суспензию ВБ штамм VRC-RZ2, содержащую 10⁷ ТЦД₅₀. По истечению 30 суток проводили разрешающее контрольное заражение вакцинированных и 2-х интактных щенков интрацеребрально штаммом CVS в дозе 50-100 МЛД₅₀. Контрольные щенки пали на 9, 10 сутки. Вакцинированные животные оставались клинически здоровыми. В сыворотках крови перорально иммунизированных животных обнаружены ВНА в титре 3-4 лог₂.

Разработка технологии приготовления вакцины для перорального применения. Получение высокоактивной вирусосодержащей суспензии.

Для изучения возможности повышения титров в вирусосодержащих суспензиях были проведены исследования по оптимизации условий культивирования ВБ штамма VRC-RZ2.

С целью определения оптимальных условий для репродукции вируса бешенства в линиях клеток ВНК-21 были проведены эксперименты, связанные с изменениями параметров культивирования: метода культивирования (стационарный - роллерный), содержания сыворотки КРС в поддерживающей среде (0, 2, 5, 10%), обработка культуры клеток перед инфицированием ДЕАЕ-декстраном, заражение во взвесь клеток и в клетки сформированного монослоя, температуры культивирования (33, 35, 37°C), множественности заражения, времени культивирования и других параметров культивирования.

В результате проведенных исследований установлены оптимальные параметры культивирования ВБ штамм VRC-RZ2 при стационарном и роллерном методе культивирования (табл.2).

Таблица 2 – Оптимальные параметры культивирования ВБ в ВНК-21

Параметры	Метод культивирования	
	стационарный	роллерный
Содержание сыворотки КРС в поддерживающей среде	2,0%	2,0%
Обработка культуры клеток перед заражением ДЕАЕ-декстраном	да	да
Температура культивирования (°С)	35	35
Множественность заражения(ТЦД _{50/кл})	0,1-1,0	0,1-1,0
Способ заражения	Во взвесь или в односуточный монослой клеток	Во взвесь или в односуточный монослой клеток
Сроки культивирования, часов	48-72	48-72
Титр инфекционности вируса (lg ТЦД _{50/мл})	5,5-6,50	6,75-7,75

Учитывая результаты проведенных исследований, следует заключить, что оптимизация условий культивирования ВБ позволила повысить титр вирусосодержащих суспензий на $0,5 \div 1,5 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$. В опытах было показано, что штамм «VRC-RZ2» при стационарном культивировании стабильно накапливается в титрах $5,50 \div 6,50 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$, а при роллерном культивировании - $6,40 \div 7,75 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Концентрирование культурального вируса бешенства

Для приготовления вакцины для перорального применения титр вируса в исходной суспензии должен составлять не менее $6,50 \text{ lg MЛД}_{50}/\text{см}^3$. При культивировании не всегда удается достичь такого титра. Для повышения биологической активности вируса, а также для снижения объема прививной дозы суспензии была изучена возможность концентрирования ВБ.

Концентрирование проводили с использованием ПЭГ-6000, ПЭПА-12000, высокоскоростного центрифугирования. Биологическую активность вируса определяли титрованием на культуре клеток ПС. Установлено, что при 100 кратном концентрировании ВБ ПЭГ-6000 происходит наименьшая потеря вируса, а титр вируса повышается на $1,90 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Выбор оптимальной стабилизирующей среды и кислотозащитной оболочки для культурального вируса бешенства

Несмотря на экспериментальное подтверждение эффективности пероральной вакцинации диких плотоядных животных имеющиеся данные об эффективности вакцинации в зависимости от аппликации вакцинного вируса в организме противоречивы. Для доставки вирусного антигена к иммунокомпетентным клеткам в области ротовой полости, глоточного кольца, используются жидкие формы препарата. С целью доставки антигена к иммунокомпетентным клеткам в кишечнике применяют лиофилизированные формы, в состав которых вводят кислотозащитные полимеры предохраняющие вирус от действия желудочного сока и растворяющиеся в кишечном соке.

В связи с отсутствием однозначных данных о преимуществах описываемых форм препаратов для создания напряженного антирабического иммунитета были изучены технологические вопросы изготовления лиофилизированных и жидких форм вакцин.

С целью подбора оптимальной стабилизирующей среды были проведены работы по изучению влияния комплексных защитных сред на культуральный вирус бешенства в процессе приготовления вакцинной жидкости и лиофилизации. Комплексные стабилизирующие среды готовили по прописям, рекомендуемым исследователями в литературных источниках: 1 – пептон (4%), лактоза (8%); 2 – желатин (1,5%), сахароза (3%), глутамат натрия (0,2%); 3 – пептон (5%), сахароза (1,5%), аминокислота (5%), гидролизат казеина (5%).

Вирусосодержащую суспензию объединяли с защитными средами в отношении 5:1; разливали по ампулам и лиофильно высушивали. На каждом этапе определяли биологическую активность вируса. В результате экспериментов установлено, наибольшей протективной способностью обладает комплексная защитная среда, содержащая пептон (4%) и лактозу (8%).

С целью выбора оптимального полимера, пригодного для образования кислотоустойчивой оболочки проведены эксперименты по изучению влияния полимеров в различных концентрациях на вирус бешенства, а также их способности защищать вирус от воздействия агрессивных факторов.

Для испытания кислотоустойчивости полученных образцов полимеров, проводили обработку препаратов 0,1 Н соляной кислотой, моделирующей воздействие на препарат желудочного сока. Для симуляции среды кишечника использовали фосфатный солевой буфер при рН 6,8 позволяющий по данным литературы растворять кислотоустойчивую оболочку препарата.

С этой целью готовили растворы пищевого желатина (2÷20%), пектина свекловичного (2÷8%), казеина (2÷20%), гуммиарабика (2÷20%), ацетофталатцеллюлозы (4-10%). Растворы полимеров объединяли с вакцинной жидкостью, перемешивали. Установлено, что биологическая активность вакцинного штамма вируса бешенства при использовании данных полимеров практически не снижается.

В результате проведенных экспериментов установлено, что воздействие соляной кислоты привело к полной инаktivации вирусной суспензии, как с защитной средой, так и без неё. Наиболее оптимальную защиту обеспечивал раствор пектина в конечной концентрации 4%. При этом отмечено снижение от первоначальной активности препарата на 0,5÷0,75 lg ТЦД₅₀ в течение 3 часов обработки.

Воздействие фосфатного буферного раствора не приводило к значимой инаktivации вирусной суспензии, как с защитной средой, так и без неё, а также в препаратах, в состав которых включен пектин.

Сравнительное изучение иммунологической эффективности сухой и жидкой формы пероральной вакцины против бешенства

С целью определения иммунологической эффективности в зависимости от формы вакцины и связанной с ней локализацией аппликации антигена проведена иммунизация собак вирусной суспензией и лиофилизированной формой препарата. Результаты экспериментов представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследования сывороток крови собак

Группа животных	Вакцинация, количество и форма препарата	Сред.геом. титр ВНА (разброс показателей), log ₂
I	Вирусосодержащая суспензия наносилась на слизистую ротовой полости, 6,5 ТЦД ₅₀	3,73 (3,0-5,0)
II	Скармливание по одной приманке содержащей капсулу с лиофилизатом вирусосодержащей суспензией, 7,0 ТЦД ₅₀	3,81 (2,0-5,0)
III	Скармливание коммерческого корма	0,00

Результаты исследования сывороток крови, показали, что в 1 и 2 группах животных выявлены ВН-антитела в титрах 3,25 – 4,33. При тестировании

сывороток крови интактных животных 3 группы отмечено отсутствие ВН-антител.

После разрешающей интрацеребральной инфекции вирусом CVS, все щенки собак 1,2 групп оставались клинически здоровыми весь срок наблюдения (21 день). Все щенки контрольной группы погибли в срок от 5 до 8 суток с клиническими признаками паралитической формы бешенства. Специфичность заболевания и гибели щенков подтверждены в РДП и МФА.

Учитывая сравнительно сходные результаты по титрам ВНА в сыворотках крови вакцинированных животных и эффективности защиты против разрешающей инокуляции вирусом CVS обе формы вакцины могут быть использованы для пероральной антирабической иммунизации. Кроме того, была подтверждена биодоступность для иммунокомпетентных клеток кишечника пероральной формы вакцины с использованием кислотоустойчивой оболочки, установленная в опытах *invitro*.

Подбор приманок-брикетов (контейнеров)

Следующий этап разработки технологии приготовления пероральной вирусвакцины предусматривал изготовление приманки, которая обладает высокой привлекательностью для целевых видов животных и способностью провоцировать у них немедленное желание к поеданию брикета содержащего вакцинный препарат.

Приготовление приманок-брикетов (контейнеров) проводили выпечкой смеси компонентов и связыванием компонентов гидрофобным полимером. В качестве основных компонентов приманки использовали мясо-костную муку, рыбную муку, животный жир, агар, куриные эмбрионы.

В качестве модели диких животных были использованы беспородные собаки в возрасте от 6 мес. до 1,5 лет. Выкладывали по 10 образцов и регистрировали предпочтение животных в поедании различных видов приманок.

Наибольшее предпочтение животные показали к приманкам, приготовленным в виде брикетов и цилиндров, в составе которых выходили мясо-костная мука, куриные эмбрионы, желатин. В меньшей степени поедались приманки, содержащие в своем составе рыбную муку и желатин. Наименьшее предпочтение у животных отмечено к приманкам, приготовленным в виде хлебцев, в состав которых входили пшеничная мука, животный жир, рыбий жир.

Изучение иммунобиологических свойств пероральной вакцины против бешенства. Сохраняемость биологической активности вирусного сырья, полуфабрикатов и антирабической вакцины при различных температурно-временных условиях хранения

Для изучения сохраняемости биологической активности культурального вируса бешенства в вирусной суспензии, полуфабрикатах и готовой вакцине определяли титр в образцах, хранящихся при различных температурно-временных режимах (рис. 4).

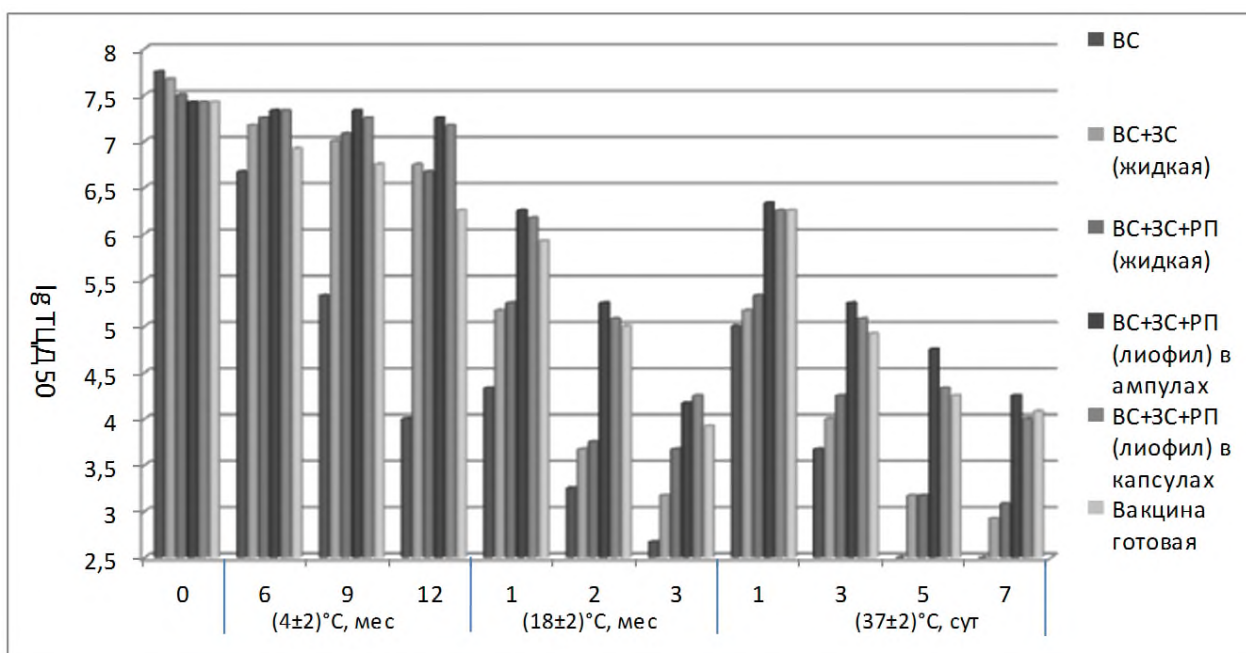


Рис. 4 - Биологическая активность культурального ВБ в вирусной суспензии, полуфабрикатах и готовой вакцине при хранении в различных температурно-временных условиях

Примечание: ВС – вирусодержащая суспензия, ЗС – защитная среда, РС – раствор пектина, Вакцина готовая – лиофилизат вируса с защитной средой и полимером, заключенный в капсулу, помещенную в приманку

Вирус в нативной суспензии подвергался значительной инактивации при всех испытанных температурно-временных режимах. В меньшей степени потери биологической активности отмечали в образцах с добавлением защитной среды и полимера. В готовом образце вакцины при температуре (4±2)°C в течение 12 мес биологическая активность вируса снизилась на 1,17 lg, а в лиофилизатах вируса в ампулах и капсулах на 0,25 lg. При температурах (18±2)°C в течение 3 мес (37,0±0,5)°C в течение 7 сут инактивация в готовых образцах вакцины и лиофилизатах вируса (капсулы, ампулы) составила более 3,0 lg.

Определение безопасности вирусвакцины

Проведено исследование безопасности вирусвакцины содержащей штамм VRC-RZ2 вируса бешенства на собаках. Испытания безвредности вирусвакцины заключалось в скармливании 10-кратной дозы (7,5 lgTCID₅₀), с последующим исследованием проб слюны, крови и головного мозга. Животные оставались клинически здоровыми весь срок опыта (90 сут). В результате опытов вирус бешенства не был выделен из головного мозга, крови и слюны опытных животных, а антиген ВБ не выявлен в МФА в различные сроки после вакцинации.

Изучение иммуногенных свойств антирабической вакцины

В опыте использовали 40 щенков собак в возрасте 6-7мес, которые были разделены на 4 групп. Были приготовлены препараты с различной дозировкой вакцинного препарата: 5,0 lgTCID₅₀, 6,5 lgTCID₅₀, 7,5 lgTCID₅₀. Брикетты с каждой дозой препарата были скармлиены каждой группе животных. Двум щенкам были

скармливаются пустые приманки. Через 14, 30, 60 сут после вакцинации у щенков брали кровь и исследовали на наличие вируснейтрализующих антител (табл. 4). Через 75 сут после вакцинации провели контрольное заражение щенков интрацеребрально ВБ штамм CVS в дозе 5000 ЛД₅₀/мл.

По результатам, представленных в табл.4, видно, что после однократного скармливания вирусвакцина индуцирует выработку вирус нейтрализующих антител до уровня $1,65 \div 1,96 \log_2$, через 14 сут после вакцинации.

Таблица 4 - Результаты исследования иммуногенной активности вирусвакцины на собаках, n=10

№ группы	Доза вакцины, lgТЦД ₅₀	Ср. геом. титры ВНА (разброс показателей), лог ₂			Результат заражения
		14 сут	30 сут	60 сут	
1	5,5	1,23 (0,5-2,0)	2,38 (1,0-3,0)	1,62 (0,5-2,0)	1/10
2	6,5	1,74 (0,5-2,0)	3,19 (2,0-4,0)	3,85(2,0-5,0)	0/10
3	7,5	1,87 (1,0-2,0)	3,66 (2,0-5,0)	4,32 (3,0-5,0)	0/10
4	0,00	0,00	0,00	0,00	10/10
Примечания:1 “+” - животное заболело;2 “-” - животное не заболело					

Через 30 сут после иммунизации отмечали повышение титров ВНА в сыворотках крови животных получивших вакцину в дозе 6,5 ТЦД₅₀ и выше на $0,5 \div 0,75 \log_2$, а через 60 сут усредненный титр ВНА составил 3,05-4,43 лог₂. У животных получивших вакцину в дозе 5,5 lgТЦД₅₀ через 60 сут наблюдали снижение титров ВНА. В результате контрольного заражения заболели все невакцинированные щенки и один из щенков получивший дозу вакцины 5,5 ТЦД₅₀. Специфичность падежа была подтверждена в МФА. Остальные щенки выжили и не показали никаких признаков заболевания бешенством.

По результатам экспериментов по продолжительности иммунитета установлено, что эффективной дозой вируса в пероральном препарате является 6,5lgТЦД₅₀, позволяющей при однократном её введении, сообщать напряженный иммунитет в течение 9мес, предохраняющий от интрацеребрального заражения штаммом CVS в дозе 1000 МЛД₅₀.

ВЫВОДЫ

1 Вирус бешенства штамм НИСХИ-МПТ адаптирован к репродукции в культурах клеток ВНК-21 и ПС. По результатам испытаний полученный культуральный вариант вируса депонирован в коллекции микроорганизмов НИИПББ под названием VRC-RZ2;

2 Отработаны оптимальные условия культивирования вируса бешенства, штамм VRC-RZ2 позволяющие получать вирусную биомассу в монослойной культуре с биологической активности $6,75-7,75 \text{lgТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Для культивирования вируса выбрана культура клеток ВНК-21, в качестве тест-системы определения биологической активности – ПС.

3 По совокупности оцененных признаков – сниженной нейтропатогенности, индексу инвазивности, результатам по оценке реверсии и спонтанной передачи – штамм VRC-RZ2 относится к группе слабовирулентных штаммов.

4 Штамм VRC-RZ2 вызывает образование антирабических ВНА при внутримышечном, подкожном пероральном методах иммунизации и защищает привитых животных от заражения ВБ штамм CVS.

5 Разработан оригинальный препарата для орального применения, представляющий собой лиофилизат вирусной суспензии, заключенный в желатиновую капсулу, помещенную в брикет приманку. Приманка обладает привлекательностью и поедаемостью для целевых животных, и низкой себестоимостью. При этом показано, что скармливание животному 10 приманок не оказывает отрицательного действия на организм.

6 Вакцина в дозе $6,5 \text{ lgTCID}_{50}/\text{cm}^3$ индуцирует выработку антирабических вируснейтрализующих антител после однократного перорального введения (титры ВНА - $3,94 - 4,00 \text{ log}_2$), а также предохраняет животных от заболевания после заражения штаммом CVS. При этом установлено, что вируснейтрализующие антитела обнаруживаются через 14 дней после вакцинации и напряженный иммунитет сохраняется в течение 9 месяцев.

7 Установлено, что вирус бешенства штамм VRC-RZ2 со стабилизирующей средой и кислотоустойчивым покрытием стабилен при хранении при $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ вирус не менее 12 месяцев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются нормативно-технические документы, утвержденные генеральным директором НИИПББ и согласованные с Комитетом ветеринарного надзора и контроля МСХ РК: Временной инструкции по изготовлению и контролю культуральной пероральной вакцины против бешенства животных; Стандарт организации на культуральную пероральную вакцину против бешенства животных [СТ 405-1919-04 ГП-073-2012]; Временное наставление по применению культуральной пероральной вакцины против бешенства животных.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жилин, Е. С. Адаптация органотканевого вируса-фикс бешенства к перевиваемым культурам клеток [Текст] / А.М. Русанова, Е.С. Жилин, С.М. Мамадалиев и др. // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний: материалы Междунар. конф. - Новосибирск, 2002. - С.269-270.
2. Жилин, Е. С. Изучение чувствительности различных линий культур клеток к вирусу бешенства штамм "VRC-RZ2" [Текст] / Е. С. Жилин, А. М. Русанова, О. В. Червякова и др. // Биотехнология. Теория и практика. - Степногорск, 2005. - №2. - С. 116-119.

4. Жилин, Е. С. Электронно-микроскопическое исследование вируса бешенства выращенного в перевиваемой культуре клеток почек сайги [Текст] / В. Л. Зайцев, А. М. Русанова, Е. С. Жилин, Е.Н. Троицкий // Биотехнология. Теория и практика.- Степногорск, 2005. - №2. - С. 111-115.
5. Жилин, Е. С. Изучение иммунобиологических свойств вируса бешенства штамма «VRC-RZ2» адаптированного к перевиваемым клеткам сирийского хомяка [Текст] / Е. С. Жилин, А. М. Русанова, О. В. Червякова, Е. Н. Троицкий // Актуальные вопросы современной биологии: материалы Междунар. конф. молодых ученых и студентов.- Алматы, 2006. - С. 90-91.
6. Жилин, Е. С. Иммунобиологическая характеристика вируса бешенства штамма «VRC-RZ2», адаптированного к перевиваемым культурам клеток сирийского хомяка [Текст] / Е. С. Жилин, А. М. Русанова, О. В. Червякова и др. // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: материалы Междунар. конф. - Ульяновск, 2006.- С. 72-74.
7. Жилин, Е. С. Эпидемиологические аспекты природной очаговости бешенства в Казахстане. I. Паразитарная система и формирование природных очагов бешенства [Текст] / А. А. Росляков, С. М. Мамадалиев, ... Е.С. Жилин и др. // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития: материалы междунар. конф.- Алматы, 2008.- С. 561-565.
8. Жилин, Е. С. Эпидемиологические аспекты природной очаговости бешенства в Казахстане. II. Паразитарная система и формирование природных очагов бешенства. Эпизоотологическая эффективность профилактической иммунизации животных против бешенства [Текст] / А. А. Росляков, С. М. Мамадалиев, ... Е.С. Жилин и др. // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития: материалы Междунар. конф.- Алматы, 2008.- С. 565-568.
9. Жилин, Е. С. Эпидемиологические аспекты природной очаговости бешенства в Казахстане. III. Бешенство – полигостальная медленная вирусная инфекция и ее значение в сохранении природных очагов болезни [Текст] / А. А. Росляков, С. М. Мамадалиев, ... Е. С. Жилин и др. // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития: материалы Междунар. конф.- Алматы, 2008. - С.569-572.
10. Жилин, Е. С. Эпидемиологические аспекты природной очаговости бешенства в Казахстане. IV. Противоэпизоотические мероприятия и факторы, определяющие их эффективность [Текст] / А. А. Росляков, С. М. Мамадалиев, ... Е. С. Жилин и др. // Биотехнология в Казахстане: проблемы и перспективы инновационного развития: материалы Междунар. конф.- Алматы, 2008.- С. 572-575.
11. Жилин, Е. С. Оценка диагностической эффективности тест-системы для выявления антигенов вируса бешенства методом твердофазного иммуноферментного анализа [Текст] / Е. С. Жилин, Ж. К. Кошематов, В. М. Матвеева и др. // АСТАНА БИОТЕХ 2011: материалы Междунар. конф.-Астана, 2011.- С.122.

12. Жилин, Е. С. Использование антиидиотипических иммуноглобулинов для выявления антирабических антител в ТФ-ИФА [Текст] / Е. С. Жилин, Ж. К. Кошеметов, В. М. Матвеева и др. // АСТАНА БИОТЕХ 2011: материалы Междунар конф.- Астана, 2011.- С.121.
13. Жилин, Е. С. Изучение иммуногенной эффективности пероральных препаратов против бешенства животных, изготовленных на основе штамма «VRC-RZ2» [Текст] / Е. С. Жилин // Биотехнология. Теория и практика.- Степногорск, 2011. - №4. - С.99-103.
14. Жилин, Е. С. Оптимизация условий культивирования вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» [Текст] / Е. С. Жилин, А. М. Русанова, О. В. Червякова // Биотехнология. Теория и практика.- Степногорск, 2011. - №4. - С.104-109.
15. Жилин, Е. С. Идентификация, выделение и изучение биологических свойств уличных изолятов вируса бешенства [Текст] / Г. Б. Мыктыбаева, Е. С. Жилин, А. Т. Татыбаева и др. // Биотехнология. Теория и практика.- Степногорск, 2012.- №1.- С.84-89.
16. Жилин, Е. С. Разработка и оптимизация условий постановки тест-системы для диагностики бешенства сэндвич методом твердофазного иммуоферментного анализа [Текст] / Е. С. Жилин, Ж. К. Кошеметов, В. М. Матвеева, А. Т. Татыбаева // Биотехнология. Теория и практика.- Степногорск, 2012.- №1.- С.77-83.
17. Жилин, Е. С. Иммуногенность и безвредность антирабической вирусвакцины для орального применения на основе вируса бешенства штамма «VRC-RZ2» [Текст] / Е. С. Жилин // Вестн. Кырг. Нац. аграр. ун-та.- 2013.- №2(29).- С.35-43.
18. Жилин, Е. С. Изучение репродукции вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» в культуре клеток почки сайги с помощью метода иммуофлуоресценции [Текст] / Е.С. Жилин // Вестн. Кырг. Нац. аграр. ун-та.- 2013.-№2(29).- С.31-35.
19. Жилин, Е. С. Адаптация органо-тканевого рабического вируса-фикс штамм "НИСХИ-МПТ" к перевиваемым культурам клеток [Текст] / Е. С. Жилин, Э. К. Акматова, А. Р. Сансызбай // Наука и новые технологии.- Бишкек, 2013.- № 4.- С151-156.
20. Жилин, Е.С. Выбор системы определения биологической активности вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» [Текст] / Е.С. Жилин, Э.К. Акматова, А.Р. Сансызбай // Изв. вузов. - Бишкек, 2013.- № 4.- С.116-119.

РЕЗЮМЕ

диссертации Жилина Евгения Сергеевича на тему: «Разработка культуральной пероральной вакцины против бешенства животных» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Ключевые слова: Бешенство, дикие животные, вакцина, приманка, иммунитет, аттенуация, культура клеток, патогенность, адаптация.

Объект исследований: штаммы вируса бешенства и пероральная вакцина против бешенства.

Цель работы: разработка антирабической вакцины для профилактики бешенства диких животных.

Методы исследований: адаптация вирусов к репродукции в культуре клеток, выявление антигена вируса методом иммунофлуоресценции, биопроба, биотехнологические методы, серологические методы.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в Казахстане получен культуральный штамм вируса бешенства, способный репродуцироваться в культуре клеток, с выраженным цитопатическим эффектом. Изучение патогенных и иммунобиологических свойств позволили рекомендовать данный штамм вируса в качестве основы для оральной вакцины против бешенства. Новизна полученных результатов подтверждена патентом на штамм «VRC-RZ2» вируса бешенства №17453 от 10.12.2004.

Подобраны оптимальная система и условия культивирования вируса бешенства штамма VRC-RZ2 позволяющие получать высокоактивные суспензии вируса. Выбрана оптимальная пропись защитной среды, кислотоустойчивой оболочки перорального препарата и оптимальный состав приманки для пероральной вакцинации животных, позволяющие доставлять вирусный антиген к иммунокомпетентным клеткам кишечника, о чем свидетельствуют титры антител, выявляемых в сыворотках крови вакцинированных животных.

Разработана отечественная технология изготовления пероральной антирабической вакцины из культурального штамма «VRC-RZ2» позволяющая снизить требования к хранению препарата и продлить срок действия препарата в условиях его применения.

Иммунобиологические свойства вакцины из культурального штамма вируса бешенства штамма VRC-RZ2, изученные в ходе экспериментов, показали эффективность данного препарата в защите против патогенного штамма CVS.

На основании полученных результатов исследований разработаны нормативно-технические документы на препарат.

Область применения: ветеринарная биотехнология.

РЕЗЮМЕСИ

06.02.02. – ветеринариялык микробиология, вирусология, эпизоотология, микотоксикологиялуу микология жана иммунология мамандыгы боюнча биологиялык илимдердин кандидаты илимдик деңгээлин изденүүгө арналган «Жаныбаркутурма оорусуна каршы культуралдуу оозаркылуу синдирилүүчү вакцинаны даярлоо» аттуу Евгений Сергеевич Жилиндин диссертациясынын

Түйүн сөздөр: кутурма оору, жапайы жаныбарлар, вакцина, татканткыч, иммунитет, аттенуация, клеткалар культурасы, патогендүүлүк, ийкемделиш (адаптация).

Изилдөө объектилери: кутурма оорусу вирусунун штаммдары жана кутурма оорусуна каршы ооз аркылуу синдирилүүчү вакцина.

Жумуштун максаты: жапайы жаныбарлардын кутурма оорусунун алдын алууга (профилактика) арналган антирабикалык вакцинаны иштеп чыгуу.

Изилдөө адиситери: вирустарды клеткалар культурасында репродукцияланууга ийкемдөө, иммунофлуоресценция адиси аркылуу вирус антигенин табуу, биологиялык үлгү, биотехнологиялык адистер, серологиялык адистер.

Алынган натыйжалар мен алардын жаңылыгы: Казакстанда биринчи жолу, клеткалар культурасында репродукцияланууга ийкемдүү, анык көрсөтүлгөн цитопатикалык таасир берүүчү кутурма оорусу вирусунун культуралдуу штаммы алынды. Патогендик жана иммунобиологиялык сапаттарын изилдөө ушул вирус штаммын кутурма оорусуна каршы ооз аркылуу синдирилүүчү вакцинага негиз ретинде сунуш кылууга мүмкүндүк туугузду. Алынган натыйжалардын жаңылыгы 2004 жылкы 10-чу декабрдагы № 17453 кутурма оорусу вирусунун «VRC-RZ2» штаммына алынган патентменен ырасталган.

Вирустун активдүүлүгү жогору суспензияларын алууга мүмкүнчүлүк берүүчү кутурма оорусу вирусунун VRC-RZ2 штаммын культивациялоодун ылайыктуу системасы менен шарттары түзүлдү. Ооз аркылуу синдирилүүчү препараттын коргоочу ортосунун, кычкылга туруктуу кабыгынын ылайыктуу нускасы жана жаныбарлардын, вирустуу антигенди ичегилердеги иммунокомпетенттүү клеткаларга жеткирүүгө мүмкүнчүлүк берүүчү ооз аркылуу вакцинациялоого арналган татканткычтын ылайыктуу курамы таңдалды, жана ал вакцинацияланган жаныбарлар канынын сывороткаларынан (сарысу) табылган антиденелер титрлерименен күбөлөндүрүлөдү.

«VRC-RZ2» культуралдуу штаммынан ооз аркылуу синдирилүүчү антирабикалык вакцинанын, препаратты сактоого коюлуучу талаптарды азайтууга жана препаратты колдонуу шарттарында анын жарамдуулук мөөнөтүн узартууга мүмкүнчүлүк берүүчү атамекендик даярлоо технологиясы иштетилип чыгарылды.

Кутурма оорусу вирусунун VRC-RZ2 культуралдуу штаммынын тажрыйбалар өткөзүү аркылуу билинген иммунобиологиялык сапаттары CVS патогендүү штаммынан коргоодо ушул препараттын тийимдүүлүгүн/таасирдүүлүгүн көрсөттү. Изилдөөлөрдүн натыйжаларынын

негизинде препаратка нормативтик-техникалык документтер иштелип чыгарылды.

Колдонулуу чөйрөсү: ветеринариялык биотехнология

Summary

Of Zhilin Yevgeniy Sergeevich's thesis on the theme: "The development of the cultural peroral vaccine against rabies of animals" for candidate's thesis of biological science for specialty 06.02.02. – veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology

Key words: Rabies, wild animals, vaccine, bait, immunity, attenuation, cell culture, pathogenicity, adaptation.

Object of research: strains of rabies virus and peroral vaccine against rabies.

Aim of the work: the development of the antirabies vaccine for prophylaxis of rabies of wild animals.

Methods of the researches: virus adaptation to the reproduction in cell culture, detection of virus antigen by immunofluorescence method, bioassay, biotechnological methods, serological methods.

The obtained results and their novelty: For the first time in Kazakhstan the cultural strain of rabies virus can reproduce in cell culture with expressed cytopathic effects are was produced. Study of pathogenic and immunobiological properties were allow to recommend this strain as the base for oral vaccine against rabies. The novelty of the obtained results is confirmed by the patent « strain VRC-RZ2 of rabies virus» #17453 dated December 10, 2004.

The optimal system and condition of cultivation of strain «VRC-RZ2» of rabies virus allowing to obtain the highly active virus suspension has been chosen. The optimal formulation of the protective medium, acid-resisting membranes of the oral preparation and the optimal composition of bait for peroral vaccination of animals allowing to deliver the viral antigen to the immunocompetent cells of the intestine as indicated by titers of antibodies detected in blood sera of vaccinated animals were selected.

The home technology for production of peroral antirabies vaccine from cultural strain «VRC-RZ2» allows to reduce requirements to preparation storage and to extend the expiration date of preparation has been developed.

The studied immunobiological properties of vaccine from cultural strain VRC-RZ2 of rabies virus was showed the effectiveness of this preparation against pathogenic strain CVS.

On the base of the obtained results of researches the normative-technical documents for this preparation have been developed.

Field of application: veterinary biotechnology.