

*На правах рукописи*

**ЛОСИЧ Милана Анатольевна**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА ERA-SV 20M  
ВИРУСА БЕШЕНСТВА И РАЗРАБОТКА НА ЕГО ОСНОВЕ  
АНТИРАБИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**

03.02.02. – вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2014 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Ивановского» Минздрава РФ и Автономной некоммерческой организации «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», г. Москва.

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Грибенча Сергей Васильевич**

доктор биологических наук,  
профессор

**Алипер Тарас Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Рыбаков Сергей Сергеевич** - доктор биологических наук, профессор, начальник научно-образовательного отдела ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Уласов Валентин Ильич** - доктор ветеринарных наук, профессор, главный научный сотрудник отдела «Всероссийской коллекции штаммов микроорганизмов» ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

**Ведущая организация:**

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко» (ВИЭВ), г. Москва

Защита диссертации состоится «\_\_» июня 2014 г. в \_\_\_\_ час на заседании диссертационного совета Д 208.131.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Ивановского» Минздрава РФ по адресу 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Ивановского» Минздрава РФ (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16).

Автореферат разослан «\_\_» мая 2014 г. и размещен на сайте <http://vak2.ed.gov.ru/>

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**Бурцева Е.И.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Бешенство – это острое нейровирусное заболевание, передаваемое человеку через укусы лисы, собаки, волка и других плотоядных животных, среди которых в естественной среде обитания вирус распространяется также при укусах. Мишенью вируса является центральная нервная система. Вирус бешенства (ВБ) принадлежит к отряду *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, поду- *Lyssaviruss* и является единственным из царства *Vira*, поражающим всех теплокровных животных, в том числе и человека со 100 % летальностью (Грибенча С.В., 2008; Львов Д.К. с соавт., 2013 и др.). Глобальный характер распространения и многогастальность рабической инфекции привели к формированию большого разнообразия вариантов ВБ: бешенство лис, собак, арктическое бешенство, бешенство скунсов, енотов, мангуст, летучих мышей и др., а также их биологических субвариантов (Львов Д.К. с соавт., 2008 и др.). Так, по оценке Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб (Бюллетень ВОЗ, 2009). В РФ бешенство регистрируется в 63 регионах страны, представляя собой серьезную угрозу как для животных, так и для человека. С ростом числа бездомных собак и кошек возрастает и число случаев обращения людей за антирабической помощью. Для профилактики бешенства у человека и животных разработаны и используются инактивированные культуральные вакцины против бешенства, а также живые оральные вакцины, которые применяются только для диких животных. При этом основным показателем иммуногенности антирабических вакцин является их способность индуцировать у иммунизированных животных синтез антирабических вируснейтрализующих антител. Поэтому решающим условием разработки вакцин является подбор такого сочетания штамма вируса и адьюванта, который позволит стимулировать у вакцинированных животных напряженный и длительный антирабический иммунитет. Сложная эпизоотическая ситуация по бешенству в РФ требует разработки

новых, более высокоиммуногенных вакцин. В связи с этим весьма актуальными представляются исследования, направленные на изучение различных штаммов ВБ и разработку технологии приготовления антирабических вакцин с использованием адъювантов нового поколения.

**Цель исследования:** изучить иммунобиологические свойства вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства и разработать на его основе антирабическую вакцину.

**Задачи исследования:**

1. Изучить спектр чувствительности различных линий клеток к вакцинному штамму ERA-CB 20M вируса бешенства.
2. Определить оптимальные условия культивирования вируса бешенства штамм ERA-CB 20M *in vitro*.
3. Изучить нейровирулентные свойства и патогенность вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства для животных при различных способах введения.
4. Изучить антигенные свойства вируса бешенства штамм ERA-CB 20M в опытах на естественно-восприимчивых животных.
5. Изучить иммуногенные свойства вируса бешенства штамм ERA-CB 20M на белых беспородных мышах методом НИИ.
6. Провести молекулярно-генетический анализ штамма ERA-CB 20M вируса бешенства.
7. Приготовить экспериментальные серии культуральной инактивированной вакцины на основе штамма ERA-CB 20M вируса бешенства в комбинации с различными адъювантами: ГОА и Abisco R-100.
8. Разработать иммуноферментную тест-систему (ИФА) на основе моноклональных антител (МкА) 1С5 для оценки содержания гликопротеина (G-белка) ВБ в вируссодержащей культуральной жидкости.

**Научная новизна работы.** Впервые для получения нового вакцинного вируса бешенства был использован новый принцип селекции, основанный на определении количественного уровня синтеза гликопротеина – главного

иммуногена вируса бешенства. Впервые определен спектр чувствительных культур клеток для репликации вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства и разработаны оптимальные условия культивирования вакцинного вируса. Определена патогенность вируса бешенства штамма ERA-CB 20M.

Впервые дана характеристика биологических свойств штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. Изучены антигенные и иммуногенные свойства вируса штамма ERA-CB 20M на различных видах животных: мышах, песцах, собаках и кошках. Впервые проведен филогенетический анализ фрагментов генов N и G вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. Установлено отличие от референтного штамма SAD1 по первичной структуре РНК на 10% и 15% соответственно.

**Практическая значимость работы.** В рамках выполненной работы на основе нового принципа селекции из популяции вируса бешенства штамм ERA получен новый вакцинный вирус штамм ERA-CB 20M с наиболее высоким уровнем синтеза G-белка, на базе которого разработана новая высокоиммуногенная антирабическая вакцина для ветеринарного применения.

Разработана технология изготовления антирабической вакцины из ВБ штамм ERA-CB 20M с использованием нового иммуностимулирующего комплекса Abisco R-100 в качестве адьюванта. Для оценки поствакцинального антирабического иммунитета у животных внедрён флуоресцентный вируснейтрализующий тест (метод FAVN), рекомендованный ВОЗ.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее пригодной для производства инактивированной культуральной антирабической вакцины из штамма ERA-CB 20M вируса бешенства является перевиваемая линия клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21-13С).
2. Способ селекции вакцинного штамма ВБ по уровню синтеза поверхностного гликопротеина (G-белка).
3. Созданные на основе штамма ERA-CB 20M экспериментальные серии вакцины против бешенства в комбинации с современным адьювантом Abisco

R-100 полностью отвечают требованиям, предъявляемым к антирабическим вакцинам.

4. Разработанная на основе МкА 1С5 иммуноферментная тест-система пригодна для контроля G-белка ВБ при производстве антирабических вакцин.

**Апробация работы.** Результаты исследований представлены и обсуждены на: Международном семинаре на базе Кубанского Аграрного Университета «Современные аспекты в диагностике и профилактике бешенства согласно требованиям ВОЗ» (г. Краснодар, 2011); XIX и XXI Московском Международном Ветеринарном Конгрессе (г. Москва, 2011, 2013); Международной научно-практической конференции «Современные методы диагностики и средств профилактики бешенства» (г. Санкт-Петербург, 2012); Международном Семинаре по вопросам контроля и борьбы с бешенством, (г. Санкт-Петербург, 2012); Rabies Serology Meeting ANSES (Нанси, Франция, 2013).

**Публикации научных работ.** По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК при Минобрнауки РФ.

**Личный вклад соискателя.** Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем. Молекулярно-биологические исследования и эксперименты по оценке эффективности вакцинных препаратов на животных выполнены совместно с сотрудниками отдела прикладной вирусологии и биотехнологии ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского». Все материалы, представленные в диссертационной работе, обобщены и проанализированы лично автором.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 137 стр. машинописного текста и состоит из общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 26 таб-

лицами и 15 рисунками. Список литературы включает 132 источника (21 отечественный и 111 зарубежных авторов).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Вирусы.** В работе были использованы следующие вирусы бешенства: вирус бешенства штамм ERA-CV 20M; референс – штаммы, представленные референтной лабораторией OIE по бешенству ANSES (Нанси, Франция): вирус бешенства CVS-11 мозговой (challenge virus standard); CVS-11 (фиксированный культуральный штамм).

**Культуры клеток.** Культивирование вируса проводили в стационарном и роллерном монослое клеток ВНК-21 (почка сирийского хомячка), BSR (клон ВНК -21), VERO (почка зеленой мартышки) и ПС (почка сайги), ВНК-О (клон ВНК -21), ВНК-Щ (клон ВНК -21). Культуры клеток получали из лаборатории ANSES и лаборатории культур и тканей ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава РФ.

**Референтные сыворотки:** референс-стандарт ВОЗ (Rabies Immunoglobulin, Copenhagen, Denmark) содержит 30 МЕ/мл; OIE референс-стандарт сыворотки соответствует 0,50 МЕ/мл ANSES (Нанси, Франция); отраслевой стандартный образец иммуногенности антирабической вакцины ФГБУ «ВГНКИ» содержит 1,0 МЕ/мл.

**Экспериментальные животные:** беспородные белые мыши (3-5-дневные, массой 6-7 г и 16-18 г); морские свинки (300-350 г); белые крысы; беспородные щенки собак (3-4 мес.); взрослые собаки; беспородные котята (3-4 мес.); взрослые кошки; песцы (10-12 мес.),

**Адьюванты.** Гидроокись алюминия ГОА – 6% гель (ФГУП «Щелковский биокомбинат»), Abisco R-100 (Isconova, Швеция).

**Определение инфекционной активности вируса.** Инфекционную активность вируса определяли методом титрования в культуре клеток (ВНК-21) и на новорожденных мышках. Титр вируса выражали в тканевых культураль-

ных инфекционных дозах  $\lg$  ТЦД<sub>50</sub>/мл (TCID<sub>50</sub>/ml) и мышинных летальных дозах МЛД<sub>50</sub>/мл.

**Инактивация вируса.** Для инактивации вируса использовали  $\beta$ -пропиолактон в разведении 1: 4000. Полноту инактивации вируса оценивали по отсутствию флюоресценции в чувствительной культуре клеток ВНК -21 в течение четырех пассажей.

**Определение патогенности вируса для животных.** Патогенность вируса определяли на различных видах животных при интрацеребральном, внутримышечном, подкожном и оральном способах введения. Культуральным вирусосодержащим материалом интрацеребрально заражали новорожденных мышей и мышей массой 6-8 г в объеме 0,03 см<sup>3</sup>, морских свинок – 0,1 см<sup>3</sup>, лис – 0,2 см<sup>3</sup>, песцов – 0,1- 0,2 см<sup>3</sup>, собак – 0,1– 0,2 см<sup>3</sup>. Культуральный вирусосодержащий материал вводили внутримышечно в объеме 0,1 см<sup>3</sup> мышам, морским свинкам – 0,5 см<sup>3</sup>, песцам, собакам и кошкам – по 1 см<sup>3</sup> вирусосодержащего материала. При подкожном заражении вирусосодержащий материал вводили мышам в объеме 0,1 см<sup>3</sup>, морским свинкам – 0,5 см<sup>3</sup>.

**Титрование вируса на белых беспородных мышах.** Инфекционную активность ВБ определяли методом титрования на новорожденных мышах. Титр вируса для заражения рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в  $\lg$  МЛД<sub>50</sub>/мл. Учет результатов титрования на мышах проводили с 5 по 30 сутки после заражения на основании клинических признаков и гибели животных. ВБ выявляли в мозговых отпечатках павших мышей методом флюоресцирующих антител (МФА).

**Реакция нейтрализации вируса (флюоресцентный вируснейтрализующий тест - FAVN).** Уровень антирабических ВНА определяли в реакции нейтрализации вируса в культуре клеток ВНК-21-13С по методике, рекомендованной OIE (2012). Результаты реакции выражали в Международных единицах на см<sup>3</sup> крови (МЕ/см<sup>3</sup>).

**Определение иммуногенных свойств.** Иммуногенные свойства вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CV 20M определяли методом НИН



(Национальный институт здоровья, США) на белых беспородных мышках массой 11-12 г, иммунизированных внутрибрюшинно с последующим интрацеребральным заражением референтным штаммом CVS-11 (мозговой штамм). Иммуногенная активность вакцины должна быть не ниже 1,0 МЕ/мл.

**Коммерческие ИФА наборы:** Для определения количества гликопротеина вируса бешенства штамма ERA-CV 20M использовали ИФА (ELISA) тест-системы компании Ingenasa (Испания), EVL (Нидерланды) и Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАН.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов.** Анализ результатов секвенирования производился с использованием BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), пакета программ, включенных в DNASTAR LaserGene 7.1 (DNASTAR, Inc.) (EditSeq, SeqMan, MegaElign) (<http://www.dnastar.com/t-allproducts.aspx>). Множественное выравнивание проводили с использованием алгоритма ClustalW Multiple Alignment (<http://www.clustal.org/>).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программ Microsoft Office Excel 2007, Stat Plus 2005.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Определение спектра наиболее чувствительной линии клеток для получения ВБ штамм ERA-CV 20M.** Для культивирования вируса штамм ERA-CV 20M было использовано 6 перевиваемых линий клеток: ВНК-21-13С, ВНК-Щ, ВНК-ф, BSR, ПС и Vero, которые заражали ВБ штамм ERA-CV 20M с активностью не менее  $10^{5,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл.1).

Из данных табл.1 видно, что максимальное накопление ВБ штамм ERA-CV 20M происходит в вирусосодержащей культуральной жидкости в линиях клеток ПС, BSR и ВНК-21-13С.

**Таблица 1**

Зависимость репродукции вируса бешенства штамм ERA-CB 20M от линии клеток и номера сбора вирусосодержащей культуральной жидкости (Инфекционная активность выражена в lg ТЦД 50/мл).  $M \pm m$ , n=10.

Линия клеток	1-й сбор lg	2-й сбор lg	3-й сбор lg	4-й сбор lg	5-й сбор lg
ПС	3,6±0,25	4,75±0,22	7,5±0,15	6,0±0,20	5,0±0,21
BSR	6,0±0,22	6,5±0,26	4,0±0,31	3,5±0,23	Н.и.
ВНК-21	3,75±0,16	4,75±0,22	6,0±0,15	Н.и.	Н.и.
ВНК-Щ	5,5±0,31	5,0±0,20	3,5±0,24	2,5±0,33	Н.и.
ВНК-ф	4,75±0,15	3,5±0,25	2,5±0,31	Н.и.	Н.и.
Vero	3,5 ±0,23	2,5±0,20	Н.и.	Н.и.	Н.и.

\* н.и.- не исследовали

**Количественное определение гликопротеина вируса бешенства.** Количественное определение гликопротеина вируса бешенства проводили с помощью отечественной ИФА тест-системы. Полученные результаты свидетельствовали о том, что наиболее высокий уровень гликопротеина был определен в следующих клетках: BSR (285 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор), ВНК-21(275 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор) и ВНК-О (270 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор).

**Оптимизация условий выращивания ВБ штамм ERA-CB 20M при помощи количественной оценки гликопротеина.** В рамках решения данной задачи были проведены исследования по определению оптимальных условий культивирования клеток ВНК-21 (табл. 2), определению оптимальной множественности заражения (табл.3) и определению оптимального протокола заражения клеток ВБ.

**Таблица 2**

Сравнительная оценка количества гликопротеина (нг/мл) вируса бешенства при использовании различных видов субстрата для ВНК-21.

Субстрат	1 сбор	2 сбор	3 сбор	4 сбор	5 сбор
Культуральный флакон	270	265	290	230	200
роллер	400	480	460	410	-

Данные, представленные в табл.2, наглядно демонстрируют преимущества роллерного культивирования ВБ штамм ERA-CB 20M по сравнению с использованием культуральных флаконов (матрасов) и заражения на монослой клеток ВНК-21.

**Таблица 3**

Определение оптимальной множественности заражения линии клеток ВНК-21 ВБ штамм ERA-CB 20M.

MOI	Количество гликопротеина, нг/мл				
	1 сбор	2 сбор	3 сбор	4 сбор	5 сбор
1,0	390	470	450	420	-
0,5	400	480	460	410	-
0,1	250	320	460	480	-
0,01	120	240	320	430	-

Полученные данные свидетельствуют о том, что оптимальной множественностью заражения является 0,5 - дальнейшее увеличение количества инфекционных частиц на клетку не приводило к увеличению количества гликопротеина в сборе; в то же время уменьшение множественности значительно снижало выход белка в первых сборах. В ходе выполнения исследований было установлено, что оптимальным моментом для заражения является 80–90% монослой культуры клеток.

**Принцип селекции ВБ штамм ERA-CB 20M.** С.В. Грибенча (2002) впервые было показано, что популяция штаммов уличного вируса бешенства гетерогенна по составу биологических вариантов, а также существует возможность выделения биологических вариантов из популяции вируса.

В исследованиях был применен разработанный нами новый принцип селекции биологических вариантов на основе количественного уровня экспрессии гена G- белка – главного иммуногена вируса бешенства. Это позволило выделить 16 биологических вариантов, которые прошли более 20 последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток ВНК-21-13С. Выделенные биологические варианты отличались от родительского вируса штамм ERA более выраженными антигенными свойствами и были обозна-

чены как варианты вируса штамм ERA-CВ 20М. Для сравнительного исследования уровня синтеза G-белка из популяции исходного родительского вируса штамм ERA было отобрано 3 варианта вируса (1а, 1б, 1в), а также 16 вариантов вируса, полученных в ходе селекций после 20 последовательных пассажей в культуре клеток ВНК-21. Варианты вируса штамм ERA-CВ 20М были отобраны из популяции родительского вируса штамм ERA. Было определено, что у всех трех вариантов (1а,1б,1в) родительского вируса штамм ERA количество G- белка (450, 520, 200 нг/мл) значительно уступало количеству G- белка (844-3100 нг/мл), определяемого у биологических вариантов (2-17) вируса штамм ERA-CВ 20М, полученных в результате селекции. Таким образом, впервые нами установлено, что количество G- белка – главного иммуногена вируса бешенства – не зависит от титра ВБ штамм ERA-CВ 20М.

**Определение нейровирулентных и патогенных свойств ВБ штамм ERA-CВ 20М.** Результаты опытов показали, что нет существенной разницы между патогенностью вируса штамм ERA и вируса штамм ERA-CВ 20М при самом высоко патогенном внутримозговом методе заражения как для молодых (6,53 и 6,83 lgLD<sub>50</sub>), так и для взрослых мышей (6,45 и 6,5 lgLD<sub>50</sub>) соответственно. Однако при внутримышечном методе заражения выявляется определенная повторяемая разница в патогенности между вирусами. Более высокая патогенность штамма ERA по сравнению с вирусом ERA-CВ 20М установлена как для молодых мышей массой 6-7 г (3,82 и <3,0 lgLD<sub>50</sub>/мл), так и для взрослых животных массой 16-18 г (1,9 и < 1,0 lgLD<sub>50</sub> соответственно). Четкие различия в патогенности вирусов ERA и ERA-CВ 20М для мышей выявлены и при подкожном методе их введения. Оба вируса оказались апатогенными при подкожном методе заражения в дозе 105000 micLD<sub>50</sub>, а также при дозе 6000 micLD<sub>50</sub> для мышей массой 12-13 г как при im, так и sc методах заражения. Аналогичная картина была установлена и в опытах на морских свинках, белых крысах, кроликах и песцах, зараженных внутримышечно и подкожно (табл.4).

Таблица 4

Сравнительное исследование патогенности вирусов бешенства штамм ERA и ERA-CB 20M для лабораторных животных и песцов

Вид животного	Метод заражения, объем в мл	Доза вируса в $MicLD_{50}$	Вирус штамм ERA		Вирус штамм ERA-CB20M	
			Заболели	Пали	Заболели	Пали
Морские свинки	im 0,5	1.580.000	4/15	2/4	1/15	0/1
	sc 0,5	1.580.000	0/5	0/5	0/5	0/5
	-	-	-	-	-	-
Белые крысы	im 0,5	1.580.000	2/5	1/2	1/10	0/1
	sc 0,5	1.580.000	1/5	0/1	0/5	0/5
Кролики «шиншилла»	im 1,0	3.160.000	0/5	0/5	0/5	0/5
	im 1,0	316.000	0/3	0/3	0/3	0/3
	sc 1,0	3.160.000	0/3	0/3	0/3	0/3
Песцы	im, 1,0	3.160.000	н.и.	н.и.	0/15	
	im, 1,0	316.000	н.и.	н.и.	0/15	
	Sc,1,0	3.160.000	н.и.	н.и.	0/15	

Примечание: *mic* – мышинный интрацеребральный  $LD_{50}$ , *im* – внутримышечный, *sc* - подкожный

Таким образом, проведенные исследования показали, что полученный на основе разработанного нами нового принципа селекции вируса с использованием количественного определения уровня экспрессии G- белка, новый вакцинный вирус штамм ERA-CB 20M оказался менее патогенен, чем родительский вирус штамм ERA. Кроме того, ВБ штамм ERA-CB 20M отличается от родительского вируса штамм ERA более высоким уровнем экспрессии гена G-белка.

**Изучение антигенных и иммуногенных свойств вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CB 20M в опытах на лабораторных и диких животных.** Антигенную активность вакцинного вируса изучали в опытах на белых мышах, белых крысах, песцах. Для иммунизации животных использовали вакцинные препараты, содержащие 200 и 1400 нг/мл G-белка. Препараты вводили однократно внутримышечно в объеме 0,1; 0,5 и 1,0 мл соответственно. На 21 день после введения титр ВНА определяли методом FAVN, а количество антигена – методом ИФА (табл.5).

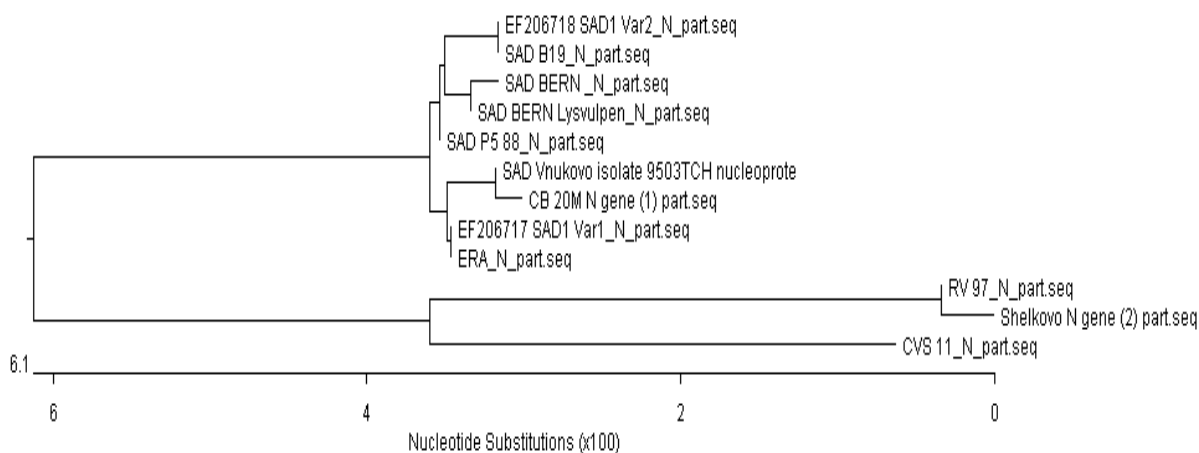
**Таблица 5**

Титр вируснейтрализующих антител в зависимости от количества G-белка ВБ

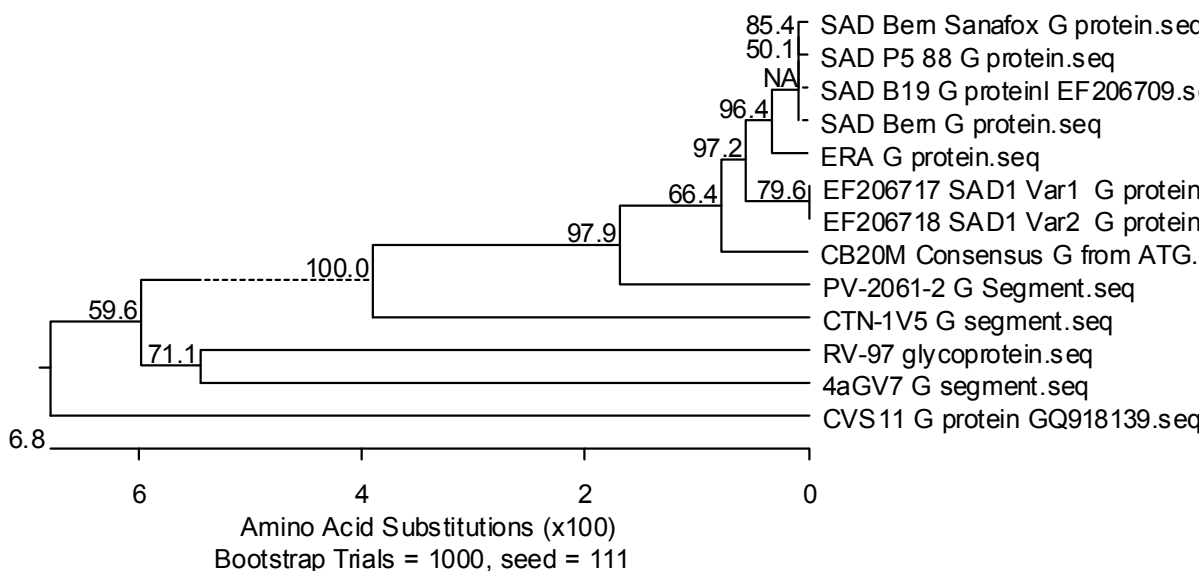
Вид животных	Концентрация G-белка в нг/мл (ИФА)	Вируснейтрализующие антитела в МЕ/см <sup>3</sup> (FAVN)
Белые мыши	200	1,51
	1400	2,87
Белые крысы	200	0,87
	1400	2,1
Песцы	1400	2,61

Как видно из табл.5, антирабическая вакцина, изготовленная из вируса штамм ERA-CB 20M, индуцирует выраженный защитный уровень вируснейтрализующих антител независимо от вида животных. Вакцина, содержащая 1400 нг/мл, индуцировала более высокий уровень ВНА, чем вакцина, содержащая 200 нг/мл. При этом все испытуемые препараты индуцировали синтез ВНА на уровне 1 МЕ/см<sup>3</sup> и выше, что соответствует требованиям ВОЗ.

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генов N и G-белка штамма ERA-CB-20M вируса бешенства.** Проводили определение первичной структуры фрагментов генов, кодирующих N-белок и G-белок. Полученные данные о нуклеотидных последовательностях генома исследуемого штамма вируса сравнивали с данными первичной структуры генома штамма Щелково-51, а также с последовательностями других вакцинных штаммов вируса бешенства из базы данных NCBI ([www.ncbi.nlm](http://www.ncbi.nlm)). Выровненные последовательности генов различных вакцинных штаммов ВБ были использованы для построения филогенетических дендрограмм с использованием программы MegaAlign из пакета программного обеспечения Lasergene фирмы DnaStar (Clustal W Method). Результаты исследований приведены на рис. 1, 2.



**Рис. 1.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе фрагментов гена размером 601 н., кодирующих N –белок вакцинных штаммов вируса бешенства.



**Рис.2.** Филогенетический анализ вакцинных штаммов вируса бешенства с использованием аминокислотных последовательностей белка G с начала открытой рамки считывания до позиции 524 (Megalign v. 7.0. (метод ClustalW)).

На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов N и G штамма ERA-CB 20M установлено, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. Сравнение с референтным штаммом SAD1 выявило 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена N и 15% - во фрагменте гена G.

**Разработка экспериментальной серии вакцины из штамма ERA-CB 20M вируса бешенства.** Для приготовления вакцин использовали вирус

бешенства (штамм ERA-CВ 20М), полученный в культуре клеток ВНК-21-13С, с активностью  $10^{6,8}$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. Вирус инактивировали β-пропиолактоном в концентрации 1:4000 в течение 2 ч при 37 °С. Полноту инактивации вируса бешенства контролировали в культуре клеток ВНК-21 по отсутствию фокусов флуоресценции через 48 ч после внесения в нее инактивированного вируса. Из одной партии инактивированного вируса бешенства штамм ERA-CВ 20М приготовили два образца препаратов с разными адьювантами: один - с 10 % ГОА (ГОА-вакцина), а второй - в комбинации с адьювантом AbISCO<sup>R</sup>-100 в концентрации 75мкг/см<sup>3</sup> (ISCOM-вакцина).

Иммуногенная активность приготовленных вакцин, определенная объемным методом НИИ на белых мышах, составила 1,39 МЕ/см<sup>3</sup> для ГОА-вакцины и 2,11 МЕ/см<sup>3</sup> для вакцины с адьювантом AbISCO<sup>R</sup>-100 (P< 0,05).

Иммуногенность вакцин изучали на белых мышах, двукратно иммунизированных с интервалом 21 сутки в дозе 0,1 см<sup>3</sup>. Средние геометрические титры антител, определенные методом FAVN, через 21 день после первой иммунизации были 1,5 МЕ/см<sup>3</sup> для ГОА-вакцины и 3,1 МЕ/см<sup>3</sup> для ISCOM-вакцины. На 21 сутки после второй иммунизации данные показатели составили 2,5 МЕ/см<sup>3</sup> и 3,9 МЕ/см<sup>3</sup> соответственно.

На 30-е сутки после второй иммунизации от мышей были получены спленоциты, которые затем были простимулированы антигеном ВБ *in vitro*. Содержание цитокинов (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4) в клетках селезенки мышей определяли методом ИФА с помощью соответствующих коммерческих наборов (EVL, Нидерланды). Было установлено, что у мышей, привитых вакциной с адьювантом AbISCO<sup>R</sup>-100, средний уровень ИФН-γ составил 1270 пг/мл, а ИЛ-2 – 700 пг/мл, что превышало аналогичные показатели у мышей, иммунизированных ГОА-вакциной - 405 пг/мл и 410 пг/мл соответственно (P< 0,05). Уровень ИЛ-4 составил 15 пг/мл и 30 пг/мл соответственно.

Антигенную активность экспериментальных образцов вакцин из ВБ штамм ERA-CВ 20М с адьювантами ГОА и AbISCO<sup>R</sup>-100 изучали на пес-



цах в сравнении с коммерческой антирабической вакциной. Для этого животных разделили на 4 группы, по 8 голов в каждой. Песцов групп с первой по третью иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом 21 сутки в дозе  $1,0 \text{ см}^3$ , животных четвертой группы не вакцинировали (контроль). Сыворотку крови всех песцов исследовали на наличие ВНА методом FAVN (табл. 6).

**Таблица 6**

Динамика вируснейтрализующих антител в сыворотке крови песцов после одно- и двукратной иммунизации разными антирабическими вакцинами

№ гр	Препарат	Уровень вируснейтрализующих антител, МЕ/ $\text{см}^3$ ( $M \pm m$ )		
		до вакцинации	на 21-е сут после первой вакцинации	на 21-е сутки после второй вакцинации
1	Коммерческая вакцина	$< 0,10$	$2,31 \pm 0,25$	$5,10 \pm 0,53$
2	ГОА-вакцина	$< 0,10$	$3,44 \pm 0,73$	$5,81 \pm 0,56$
3	Вакцина с адьювантом Abisco R-100	$< 0,10$	$4,54 \pm 0,40$	$14,58 \pm 1,15$
4	Контроль	$< 0,10$	$< 0,10$	$< 0,10$

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что вакцина с адьювантом Abisco R-100 индуцировала синтез ВНА в высоких титрах. У животных контрольной группы сероконверсии отмечено не было.

**Изготовление экспериментальных образцов антирабических вакцин для собак и кошек.** Экспериментальные серии антирабических вакцин были изготовлены из штамма ERA-CB-20M с AbISCO<sup>R</sup>-100 в качестве адьюванта. Были изготовлены 3 опытные серии вакцины против бешенства собак («РАБИКС») и 3 опытные серии вакцины против бешенства кошек («РАБИФЕЛ»). Все серии вакцины содержали инактивированный, с проверенной полнотой инактивации, вирус бешенства штамм ERA-CB 20M с активностью от 6,5 до 7,0 lg ТИД<sub>50</sub>/ $\text{см}^3$ . В качестве адьюванта использовался

AbISCO<sup>R</sup>-100 в концентрации 75 мкг/см<sup>3</sup> в вакцине для собак и 30 мкг/см<sup>3</sup> в вакцине для кошек. Все исследуемые серии вакцины «РАБИКС» и вакцины «РАБИФЕЛ» представляли собой прозрачную жидкость розового цвета с незначительным осадком, разбивающимся при встряхивании в гомогенную взвесь. Наличия или образования посторонних примесей, изменения внешнего вида и pH, нарушения целостности флаконов не было отмечено ни сразу после изготовления препаратов, ни через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре от 2 до 8<sup>0</sup>С. В течение всего периода наблюдений в питательных средах с посевами роста бактериальной и грибной микрофлоры не наблюдалось.

Определение безвредности всех экспериментальных серий вакцин проводили сразу после их приготовления, а также через 6, 12 и 18 месяцев хранения при температуре от 2 до 8<sup>0</sup>С. Оценку безвредности и реактогенности вакцины «РАБИКС» проводили на беспородных щенках 8-10-недельного возраста и белых мышах массой 12-15 г. Щенкам препараты вводили подкожно в область лопатки в дозе 5,0 см<sup>3</sup>, мышам – подкожно в объеме 0,2 см<sup>3</sup> однократно. Учет результатов безвредности проводили в течение 21-го дня после введения препарата (срок наблюдения).

Оценку безвредности вакцины «РАБИФЕЛ» проводили на беспородных котят 8-10-недельного возраста и белых мышах массой 12-15 г. Котятам препараты вводили подкожно в область лопатки в дозе 5,0 см<sup>3</sup>, мышам - подкожно в объеме по 0,2 см<sup>3</sup> однократно. Учет результатов безвредности проводили в течение всего срока наблюдения.

Клинические обследования животных показали, что введение вакцин «РАБИКС» и «РАБИФЕЛ», свежеприготовленных или хранившихся в течение 6, 12 или 18 месяцев, не вызвало у животных отклонений в состоянии здоровья и побочных эффектов.

**Определение иммуногенной и антигенной активности вакцин.** Иммуногенную активность экспериментальных серий вакцин определяли объ-

емным методом НИ на белых мышах сразу после приготовления и в процессе хранения при температуре от 2 до 8<sup>0</sup>С (табл. 7).

**Таблица 7**

Иммуногенная активность вакцин «РАБИКС» и «РАБИФЕЛ» на разных сроках хранения

Препарат	Иммуногенность (МЕ/см <sup>3</sup> )			
	< 1 месяца	6 месяцев	12 месяцев	18 месяцев
Исследуемая серия вакцины «РАБИКС»				
1	1,64	1,39	1,25	1,25
2	2,02	1,64	1,5	1,49
3	2,37	1,72	1,72	1,64
Исследуемая серия вакцины «РАБИФЕЛ»				
1	1,72	1,64	1,25	1,22
2	2,07	2,02	1,72	1,5
3	2,5	2,37	2,02	1,72

Антигенную активность каждой серии вакцины «РАБИКС» и «РАБИФЕЛ» определяли на песцах и котятах соответственно. Животных иммунизировали подкожно смесью из 5 флаконов каждой серии вакцины в дозе 1,0 см<sup>3</sup>. Через 21 день инъекцию повторяли. Сыворотки крови песцов и котят исследовали на наличие антител к вирусу бешенства методом FAVN до вакцинации и через 21 день после введения вакцины (табл.8).

Было отмечено, что у всех вакцинированных животных на 21 день после первой вакцинации уровень антирабических антител превышал 0,5 МЕ/см<sup>3</sup>. После повторной инъекции препаратов уровень ВНА был достоверно выше (p<0,01).

Таблица 8

Антигенная активность экспериментальных серий вакцин  
на разных сроках хранения

Время после изготовления вакцины	№ серии	Средние геометрические титры антител (МЕ/см <sup>3</sup> ) n=4		
		До введения	После 1-го введения	После 2-го введения
<b>Вакцина «РАБИКС»</b>				
Менее 1 мес.	1	0,11	1,34	7,60
	2	0,16	1,43	8,23
	3	0,18	1,38	6,96
6 мес.	1	0,11	1,91	8,08
	2	0,10	1,47	6,13
	3	0,14	1,29	6,33
12 мес.	1	0,14	1,45	7,44
	2	0,11	1,34	7,24
	3	0,11	1,43	5,22
18 мес.	1	0,14	2,30	6,76
	2	0,10	0,55	9,06
	3	0,18	1,91	6,53
<b>Вакцина «РАБИФЕЛ»</b>				
Менее 1 мес.	1	0,10	1,20	8,71
	2	0,14	2,03	11,48
	3	0,14	1,29	10,02
6 мес.	1	0,11	1,34	7,44
	2	0,16	1,43	9,54
	3	0,18	1,38	8,08
12 мес.	1	0,11	2,30	10,65
	2	0,14	0,55	7,60
	3	0,10	1,91	9,06
18 мес.	1	0,18	1,47	8,23
	2	0,11	1,29	6,96
	3	0,14	1,45	9,54

**Оценка антигенной активности вакцин на домашних животных.**

Вакциной «РАБИКС» иммунизировали клинически здоровых щенков и взрослых собак пород немецкая овчарка и лабрадор общим числом 32 го-

ловы. Вакциной «РАБИФЕЛ» иммунизировали клинически здоровых котов и кошек различных пород и возрастов числом 26 голов. Ранее не вакцинированным от бешенства животным вакцины вводили подкожно двукратно, с интервалом 21 день, ранее вакцинированным – однократно. После вакцинации у животных брали пробы сыворотки крови, которые проверяли на наличие антител к вирусу бешенства методом FAVN. В результате проведенных исследований было установлено, что у всех вакцинированных животных на 21 день после последней вакцинации уровень антирабических антител значительно превышал  $0,5 \text{ ME/cm}^3$  и составлял  $3,46 - 18,01 \text{ ME/cm}^3$ .

**Разработка ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) ВБ в вирусосодержащей культуральной жидкости.** Основным иммунологическим компонентом разработанной тест-системы в формате «сэндвич»-ИФА стали ранее полученные С.В. Грибенча МкА 1С5 со строгой специфичностью к эпитопам гликопротеина как фиксированного, так и уличного вируса бешенства. Очищенные МкА использовали для абсорбции на поверхности лунок 96-луночного планшета (первичные, или фиксирующие) и в качестве иммунопероксидазного конъюгата (вторичные, или детектирующие).

Проведенные эксперименты показали, что разработанная тест-система позволяет дискриминировать пробы с различным содержанием гликопротеина вируса бешенства и не дает перекрестных реакций с представителями других семейств вирусов. Установлено, что инактивация вируса  $\beta$ -пропиолактоном не влияла на содержание G-белка в пробе.

Далее эту тест-систему сравнивали с зарубежными аналогами при оценке содержания гликопротеина ВБ в культуре клеток ВНК-21. Максимальный коэффициент корреляции зафиксировали между разработанной нами тест-системой и ИФА-набором фирмы Ingenasa ( $r=0,87$ ;  $p<0,01$ ). При исследовании проб с разным содержанием G-белка в диапазоне от 10 до 300 нг/мл ( $n=31$ ) установили положительную корреляцию между обратной величиной титра гликопротеина и его концентрацией ( $r=0,9$ ;  $p<0,01$ ), а чувствительность созданного ИФА и его зарубежного аналога составила 20

нг/мл. При исследовании образцов с установленным титром вируса бешенства ( $n=12$ ) гликопротеин выявляли в пробах с инфекционной активностью от  $10^3$  ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и выше при отсутствии положительной корреляции между показателями.

На заключительном этапе мы оценивали степень корреляции между уровнем гликопротеина вируса бешенства в образцах вирусосодержащей жидкости, выявляемого в ИФА, и иммуногенностью вакцин, приготовленных из этих образцов вакцин, которую оценивали методом НИИ.

Полученные результаты указывают на наличие положительной корреляции между относительным содержанием G-белка в экспериментальных образцах вакцины, определяемым в ИФА, и индексом иммуногенности ( $r=0,89$ ;  $p<0,05$ ). Препараты с титром в ИФА  $\geq 1:160$  обладали иммуногенной активностью (индекс иммуногенности  $\geq 1$  МЕ/см<sup>3</sup>), соответствующей требованиям ВОЗ.

Таким образом, ИФА можно использовать на этапе предварительного контроля количества гликопротеина ВБ при производстве антирабических вакцин.

## **ВЫВОДЫ**

1. Установлено, что наиболее чувствительными к вирусу бешенства штамм ERA-CВ 20М являются перевиваемые линии клеток: ПС, BSR, и ВНК-21-13С, в которых он накапливается в титрах:  $7,5 (\pm 0,15)$ ,  $6,5 (\pm 0,26)$  и  $6,0 (\pm 0,15)$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно.

2. Оптимизированы условия получения ВБ штамм ERA-CВ 20М при стационарном и роллерном способах культивирования. Концентрация клеток перевиваемой линии ВНК-21-13С должна составлять не менее  $2 \times 10^6$  клеток/мл при множественности инфицирования клеток  $0,1-0,01$  ТЦД<sub>50</sub>/мл.

3. Вакцинный штамм ERA-CВ 20М вируса бешенства является патогенным для белых мышей при интрацеребральном способе введения. При внутримышечном и подкожном способах заражения штамм является слабо-

патогенным для мышей, белых крыс и морских свинок и непатогенным для кроликов, собак, кошек и песцов.

4. Вакцинный штамм ERA-CB 20M вируса бешенства обладает выраженными антигенными свойствами, индуцируя выработку вируснейтрализующих антител у мышей, белых крыс, песцов, кошек и собак в титрах, значительно превосходящих защитный, пороговый уровень ( $0,5 \text{ ME}/\text{cm}^3$ ).

5. Вакцинный штамм ERA-CB 20M вируса бешенства обладает выраженными иммуногенными свойствами, что было продемонстрировано в экспериментах на белых мышках с использованием метода НИИ. Иммуногенность экспериментальных образцов вакцинных препаратов составила  $1,5\text{--}2,2 \text{ ME}/\text{cm}^3$ , препараты сохраняли свои иммуногенные свойства на протяжении 18 месяцев.

6. На основании филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов N и G штамма ERA-CB 20M установлено, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. Сравнение с референтным штаммом SAD1 выявило 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена N и 15% - во фрагменте гена G.

7. При сравнительном испытании различных типов адьювантов: ГОА и Abisco R-100 в экспериментальных условиях показано, что выраженным иммуностимулирующим эффектом обладает Abisco R-100.

8. Разработана ИФА тест-система для оценки содержания гликопротеина вируса бешенства в культуральной вируссодержащей жидкости на основе моноклональных антител 1С5. Установлена положительная корреляция результатов, полученных в ИФА и методом НИИ ( $r=0,89$ ;  $p<0,05$ ). Препараты с титром в ИФА  $\geq 1:160$  обладали пороговой защитной иммуногенной активностью.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Материалы исследований по разработке и применению вакцин на основе штамма ERA-CV 20M вируса бешенства вошли в следующие нормативные документы:

1. Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для ветеринарного применения № 77-1-17.11-0484№ПВР-1-17.11/02758, выданное Россельхознадзором 31.10.2011 г.

- Стандарт организации на Вакцину против бешенства собак инактивированную «РАБИКС» «СТО 76418883-0009-2011» от 31 октября 2011 г.

- Инструкция по применению вакцины против бешенства собак инактивированной «РАБИКС», утвержденная Россельхознадзором 31 октября 2011 г.

2. Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для ветеринарного применения № 77-1-17.11-0485№ПВР-1-17.11/02759, выданное Россельхознадзором 31.10.2011 г.

- Стандарт организации на Вакцину против бешенства кошек инактивированную «РАБИФЕЛ» «СТО 76418883-0008-2011» от 31 октября 2011 г.

- Инструкция по применению вакцины против бешенства кошек инактивированной «РАБИФЕЛ», утвержденная Россельхознадзором 31 октября 2011 г.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Грибенча С.В., Лосич М.А., Грибенча Л.Ф., Непоклонова И.В./Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка – главного иммуногена вируса бешенства.//Вопросы Вирусологии.-2012г.-№2-С.44-47.

2. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И./Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства//Вопросы Вирусологии.-2013, Том 58,№-5 с.38-43.

3. Лосич М.А., Непоклонова И.В., Мухин А.Н., Раев С.А, Грибенча С.В., Верховский О.А., Алипер Т.И./Разработка и иммунобиологические



свойства новой антирабической вакцины «РАБИФЕЛ»/Российский Ветеринарный Журнал.-2012.-№2.- С.10-14.

4. **Лосич М.А.**, Непоклонова И.В. Верховский О.А.. Грибенча С.В.. Баландина М.В., Мухин А.Н, Раев С.А., Алипер Т.И. / Разработка и использование ИФА для оценки содержания гликопротеина (G-белка) вируса бешенства// Ветеринария.-2012.-№7.-С.30-35.

5. **Лосич М.А.**, Непоклонова И.В., Верховский О.А., Грибенча С.В., Мухин А.Н., Раев С.А., Алипер Т.И./ Иммунобиологические свойства новой вакцины Рабикс//Ветеринария.- 2011.-№12.-С.17-21.

#### **Работы, опубликованные в сборниках научных трудов, материалах конференций, съездов и других изданиях**

1. Яровая И.И., Колотвина П.В., **Кохнович (Лосич) М.А.**, Грибенча С.В.//Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Частная вирусология. Вирус бешенства.- 2012 г.-Том 2,- С.645-649.

2. Грибенча С.В., Литвин А.А., **Кохнович (Лосич) М.А.** Сергиенко В.И., Стовбун С.В., Безмен В.Г// Защитная активность препарата Панавир при экспериментальной рабической инфекции.//Антибиотики и Химиотерапия.-2009.-Том 54.- №5-6, -С. 31-36.

3. **Лосич М.А.**, Непоклонова И.В. Верховский О.А //Оценка напряженности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства у мелких домашних животных.//Материалы 19 Московского Международного Ветеринарного Конгресса // 2011 г. с.- 21-22.

4. **Losich Milana**, Aliper T.I./ Analysis of vaccine-induced antirabic humoral immunity in carnivores (dogs, cats and grey foxes)/ Rabies serology meeting, ANSES, Nansy, Franse, 2013, p.10.

#### **Благодарности**

Автор приносит глубокую благодарность за оказание научно-методической помощи в организации проведения исследований д.б.н., профессору Верховскому О.А., к.в.н. Непоклоновой И.В., д.б.н., профессору Гребенниковой Т.В., к.б.н. Мухину А.Н., к.в.н. Раеву С.А.