

МЕТЛИН Артем Евгеньевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ И АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ
ВИРУСА БЕШЕНСТВА**

16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология»

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**



Владимир – 2004 г.

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор
РЫБАКОВ Сергей Сергеевич

Официальные оппоненты – доктор ветеринарных наук, профессор
РАХМАНОВ Анатолий Михайлович
(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир);

– доктор ветеринарных наук
НЕДОСЕКОВ Виталий Владимирович
(ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва).

Ведущая организация: НГУ «Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко» (г. Москва).

Защита диссертации состоится «25» января 2005 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, п. Юрьеvec.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Автореферат разослан «22» декабря 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Г.М. Семенова

2005-4
49037

969196
1

1. Общая характеристика работы

Актуальность темы. Бешенство – это широко распространенное инфекционное заболевание теплокровных животных и человека, которое проявляется расстройствами функции центральной нервной системы, параличами и энцефаломиелитом. Оно регистрируется на территории более 80 стран мира, в большинстве из которых, в том числе и в России, в последние годы отмечается постоянный рост количества случаев этой болезни (А.В. Зайковская и др., 2004; Rabies bulletin Europe, 2003, 2004).

Вирус бешенства принадлежит к порядку Mononegavirales, семейству Rhabdoviridae, которое включает, по крайней мере, три рода вирусов животных: Lyssavirus, Ephemerovirus и Vesiculovirus (N. Tordo et al., 1988).

Бешенство входит в пятёрку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший экономический ущерб, который складывается из потерь в результате падежа животных, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, на отлов бродячих собак и кошек, регулирование численности диких хищников, а также на проведение диагностических исследований (И.П. Арутюнова, 2000). Большие средства расходуются на постэкспозиционное лечение людей, имевших контакт с большими животными.

По данным ВОЗ, ежегодно в мире от бешенства умирает от 35000 до 50000 человек (Rabies bulletin Europe, 1999). В связи с тем, что бешенство является летальной инфекцией, и имеет важное социальное значение, необходима точная и своевременная диагностика этой болезни, особенно в случае опасности передачи бешенства человеку. В России для диагностики бешенства используются методы, которые имеют некоторые недостатки. В частности, постановка биопробы на мышах может занимать до 30 дней.

Для борьбы с бешенством в дикой природе разработаны и применяются оральные антирабические вирусвакцины (К.Н. Груздев и В.В. Недосеков 2001; А.З. Равилов и др., 2000; В.И. Жестерев и О.Г. Лаптева, 2004). Однако,

РОС. НАЦИОНАЛ.
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
03 ЮН 5 акт 48

некоторые авторы высказывают опасения, связанные с наличием остаточной патогенности аттенуированных вакцинных штаммов вируса бешенства (P. Pastoret et al., 1999; A. Wandeler, 2000; В.С. Иванов, 2000). В связи с этим, немаловажным является изучение молекулярно-биологических характеристик вакцинных штаммов вируса бешенства и полевых изолятов, циркулирующих на территории России, с целью разработки методов, позволяющих дифференцировать полевые изоляты и вакцинные штаммы вируса бешенства. Для этих целей могут быть использованы ПЦР, нуклеотидное секвенирование и моноклональные антитела (МКА). С помощью указанных методов можно проводить генотипирование полевых изолятов вируса бешенства, идентифицировать различные антигенные варианты и дифференцировать их от вакцинных штаммов (N. Tordo et al., 1988, 1996; J. Cox et al., 1992; S. Nadin-Davis et al., 2000; В.В. Недосеков и др., 2002). Благодаря использованию нуклеотидного секвенирования, было выявлено несколько новых генотипов вируса бешенства (Y. Arai et al., 2003; A. Botvinkin et al., 2003).

Таким образом, актуальной задачей является усовершенствование существующих методов лабораторной диагностики, а также разработка современных методов, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и нуклеотидного секвенирования, позволяющих выявлять и дифференцировать полевые изоляты и вакцинные штаммы вируса бешенства. Существенным моментом в борьбе и профилактике бешенства является необходимость совершенствования методов выявления антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных животных с целью постоянного контроля эффективности и безопасности антирабических вакцин.

Цель и задачи исследований. Основной целью работы являлось сравнительное изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства и оценка оральных антирабических вирусвакцин, приготовленных из штаммов PB-97 и SAD B19.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Получить антирабический флюоресцирующий глобулин, пригодный для первичного отбора изолятов вируса, с целью создания их коллекции и разработки набора для диагностики бешенства методом иммунофлюоресценции.
2. Изучить в сравнительном аспекте антигенные свойства полевых изолятов и вакцинных штаммов (PB-97, SAD B19, "Овечий") вируса бешенства с использованием панели моноклональных антител.
3. Провести анализ последовательностей нуклеотидов фрагментов N-, G-гена и ψ -региона полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории России, Финляндии и Эстонии, и G-гена вакцинного штамма PB-97 вируса бешенства.
4. Создать банк данных нуклеотидных последовательностей генома полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории России.
5. Сравнить на лисицах иммуногенность и безвредность оральных антирабических вакцин, приготовленных из штамма PB-97 (вирусвакцина для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства "Синраб", Россия) и из штамма SAD B19 (живая антирабическая вакцина "Фуксорал" для оральной иммунизации диких животных, Германия).

Научная новизна работы. Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований:

- Изучена генетическая гетерогенность и антигенность изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с помощью ПЦР, нуклеотидного секвенирования и моноклональных антител.
- Впервые определена нуклеотидная последовательность фрагментов N-, G-генов и ψ -региона 24 полевых изолятов вируса бешенства,

выделенных на территории России в 2001-2004 гг., и 2 вакцинных штаммов вируса бешенства, а также проведено сравнение полученных последовательностей с опубликованными в EMBL данными по первичной структуре различных изолятов и штаммов вируса бешенства.

- Впервые определена нуклеотидная последовательность G-гена и аминокислотная последовательность гликопротеина вакцинного штамма РВ-97 вируса бешенства.
- Дана экспериментальная оценка иммуногенности и безвредности для лисиц оральных антирабических вирусвакцин, приготовленных из штамма РВ-97 ("Синраб", Россия) и штамма SAD B19 ("Фуксорал", Германия).

Практическая значимость работы. Результаты проведенных исследований использованы при разработке следующих нормативно-технических документов:

- «Методические указания по отбору проб мозга для диагностики бешенства и сывороток крови с целью определения титра антител», утвержденные руководителем Департамента ветеринарии Минсельхоза России 03.04.2001.
- Комплект нормативно-технической документации на набор для диагностики бешенства методом иммунофлюоресценции: ТУ, временная инструкция, методические рекомендации, утвержденные директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» 20.11.2004;
- «Методические указания по применению реакции подавления иммунофлюоресценции (РПИФ) для выявления антител к вирусу бешенства», утвержденные директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» 10.01.2003.

Кроме того, создан банк данных нуклеотидных последовательностей фрагментов N-гена, G-гена и ψ -региона 24 изолятов вируса бешенства, выделенных на территории России, Финляндии и Эстонии, который

используется для идентификации и дифференциации вновь выделяемых изолятов вируса бешенства. Нуклеотидная последовательность G-гена штамма РВ-97 используется для сравнения ее с другими вакцинными штаммами и полевыми изолятами вируса бешенства.

Показана иммуногенность и безвредность для лисиц оральной антирабической вирусвакцины “Синраб”, производящейся в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» из штамма РВ-97.

Публикации научных работ. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ.

Апробация работы. Результаты, полученные в ходе подготовки диссертации, доложены и опубликованы в материалах научных конференций: “Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС. Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески. болезнь Тешена” (г. Покров, ВНИИВВиМ, 2001); “Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей” (г. Покров, ВНИИВВиМ, 2002 г.); “Актуальные проблемы инфекционной патологии животных” (г. Владимир. ФГУ ВНИИЗЖ, 2003 г.); “Профилактика бешенства животных и заразных болезней рыб в Северо-Западном регионе России и Северных провинциях Баренцрегиона” (г. Мурманск, 2003 г.); на республиканской научно-практической конференции ветеринарных врачей (Карелия, г. Петрозаводск. 2003 г.); на Американско-Российском семинаре “Проблемы контроля бешенства и методы производства и применения оральных вакцин для бродячих собак, кошек и диких плотоядных” (г. Покров, Покровский завод биопрепаратов, 2004 г.), а также на заседаниях ученого совета ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в 2002-2004 гг.

Структура и объем диссертации. Исследования по диссертационной работе проводились в 2000-2004гг. в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных». Диссертация изложена на 151 странице и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования,

обсуждение результатов, выводы, практические предложения. Список литературы включает 196 источников, в том числе 33 отечественных и 162 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 24 таблицами, 18 рисунками и дополнена приложениями.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Набор для отбора полевых изолятов вируса бешенства и диагностики бешенства методом иммунофлюоресценции.
- Создание коллекции полевых изолятов вируса бешенства и результаты изучения ее с помощью моноклональных антител.
- Нуклеотидные последовательности фрагментов N-, G-гена и ψ -региона 24 полевых изолятов, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, и 2 вакцинных штаммов вируса бешенства.
- Нуклеотидная последовательность G-гена и аминокислотная последовательность гликопротеина вакцинного штамма PB-97.
- Результаты сравнительного испытания на лисицах иммуногенности и безвредности оральных антирабических вакцин “Синраб” и “Фуксорал”, созданных на основе штаммов PB-97 и SAD B19, соответственно.

2. Собственные исследования

Материалы и методы. В работе использовали 154 полевых изолята и 5 аттенуированных штаммов вируса бешенства, а также 2 оральные антирабические вакцины (вирусвакцина для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства “Синраб”, Россия и живая антирабическая вакцина “Фуксорал” для оральной иммунизации диких животных, Германия). С целью проведения сравнительных испытаний диагностического набора РИФ использовали коммерческие антирабические ФИТЦ-глобулины производства “Centocor” (США), “Bio-Rad” (Франция) и производства ВНИВИ (г. Казань, Россия). Для изучения антигенных характеристик полевых изолятов и фиксированных штаммов вируса бешенства использовали панель из 5 мышинных антинуклеокапсидных моноклональных

антител (МКА): W-239.17, W-187.5, W-187.11.2, MW-187.6.1 и P-41. (J. Cox, Тюбинген, Германия). Расчет праймеров проводили на основании нуклеотидных последовательностей геномов вируса бешенства, опубликованных в EMBL, и результатах собственных исследований при участии А. Huovilainen (г. Хельсинки, Финляндия). При проведении экспериментов использовали химические реактивы фирм “Sigma”, “Serva”, “Fluka”, “Merck”, “GeneAmp”, “Finnzymes”, “Invitrogen”, “OXOID”, а также реактивы российского производства марки “ч.д.а.” и “х.ч.”.

Отбор проб. Пробы головного мозга и крови отбирали в соответствии с разработанными «Методическими указания по отбору проб мозга для диагностики бешенства и сывороток крови с целью определения титра антител». Пробы головного мозга от больных и подозреваемых в заболевании бешенством животных получали из региональных ветеринарных лабораторий России. Также использовали изоляты вируса бешенства, выделенные в Финляндии в 1988-1989 гг. (M. Nyberg et al., 1992) и в Эстонии в 1991 г. (K. Kulonen et al., 1993).

Подготовка антигена. Очистку и концентрирование вируса бешенства проводили в соответствии с методикой, предложенной А.П. Пономаревым с соавт. (2001). Использовали суспензию инактивированного вируса бешенства, штамм “ВНИИЗЖ”, полученную путем его репродукции в культуре клеток ВНК-21. Проводили комплексную очистку, концентрирование вируса ультрацентрифугированием и дополнительную очистку в градиенте CsCl.

Иммунизация животных. Для получения антирабических антител кроликов иммунизировали дважды полученным препаратом вируса с интервалом в 40-42 дня (Н.А. Назаров и др., 2002).

Получение флюоресцирующего глобулина (ФИТЦ-глобулина). Из сыворотки крови иммунизированных животных получали фракцию IgG методом трехкратного высаливания сульфатом аммония и оценивали в ИФА. ФИТЦ-глобулин готовили общепринятым методом (F. Meslin et al., 1996).

Приготовление контрольных препаратов. Положительные контроли готовили из суспензии головного мозга кроликов, зараженных штаммом CVS вируса бешенства, которую инактивировали с использованием β -пропиолактона и лиофилизировали. Для приготовления отрицательных контролей использовали головной мозг кроликов, не содержащий вируса бешенства. Постановку прямого варианта реакции иммунофлюоресценции (РИФ) и биопробы на мышах осуществляли в соответствии с ГОСТом 26075-84.

Выделение и изучение вируса бешенства в культуре клеток. Выделение полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса проводили в культурах клеток MNA и ВНК-21 с применением опубликованных ранее методик (К. Kulonen et al. 1991; OIE Manual, 2000). Изучение антигенных свойств вирусов, выделенных в культуре клеток, проводили с использованием МКА в непрямом варианте РИФ.

Определение уровня антирабических антител. Уровень антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотках крови определяли в соответствии с разработанными «Методическими указаниями по применению реакции подавления иммунофлюоресценции (РПИФ) для выявления антител к вирусу бешенства».

Выделение РНК и синтез кДНК. Суммарную РНК выделяли из 10% суспензии головного мозга с использованием набора "Rneasy Mini Kit" (QIAGEN®, Великобритания). Синтез кДНК проводили в объеме 5 мкл раствора, содержащего очищенную суммарную РНК, при 37⁰С в течение 90 мин. с добавлением 150 ед. обратной транскриптазы MuLV (вирус лейкемии мышей, Applied Biosystems), 5 пмоль универсального праймера (Random Hexamers, Applied Biosystems).

ПЦР. Все ПЦР-смеси включали 5 мкл 10-кратного буфера для ДНК-полимеразы, 5 пмоль каждого праймера, 1 ед. Dуназyme II ДНК полимеразы, 1 мкл 10 мМ dNTP и воду до объема 48 мкл. Проводили 35 циклов амплификации, каждый из которых включал денатурацию кДНК при 94⁰С в течение 1 мин., отжиг праймеров при 55⁰С в течение 1 мин. и полимеризацию

при 72⁰С в течение 1 мин. (для амплификации протяженных фрагментов G-гена штамма РВ-97 – 1,5 мин.).

Очистка ПЦР-продуктов и нуклеотидное секвенирование. Очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора “MicroSpin S-400HR” (Amersham Pharmacia Biotech, США). Полученные препараты секвенировали с использованием 16 капиллярного автоматического секвенатора АВІ 3100 (Applied Biosystems) в Институте биотехнологии Хельсинского университета (г. Хельсинки, Финляндия).

Филогенетический анализ. Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакеты программ Staden Package v.2003.0-beta (R. Staden et al., 2002) и SEQPROGS (K. Knowles, 1992), а также программу Align v.1.01 (Scientific and Educational Software, 1989).

Статистическую обработку результатов, полученных в ходе выполнения данной диссертационной работы, проводили с использованием компьютерной программы Microsoft[®] Excel 2002 (10.4302.2625).

3. Результаты собственных исследований

Разработка и испытание набора препаратов для диагностики бешенства в РИФ. Для оценки полученного ФИТЦ-глобулина “ВНИИЗЖ” провели сравнительное исследование положительных проб головного мозга и сывороток крови с использованием антирабических ФИТЦ-глобулинов “ВНИИЗЖ”, “Bio-Rad” и “Centocor”. Сравнительные испытания проводили в РИФ, РПИФ и путем выделения вируса бешенства в культурах клеток ВНК-21 и МНА.

В результате проведенных исследований установлено, что ФИТЦ-глобулин “ВНИИЗЖ” по активности и специфичности не уступает ФИТЦ-глобулинам “Bio-Rad” и “Centocor”. Кроме того, ФИТЦ-глобулин “ВНИИЗЖ” можно использовать для выявления полевых изолятов и фиксированных штаммов вируса бешенства, выделенных в культурах клеток ВНК-21 и МНА, а также для определения уровня ВНА.

В связи с тем, что положительные контрольные препараты, предлагаемые далее для контроля активности ФИТЦ-коньгатов и специфичности РИФ должны быть безопасны, возникла необходимость разработки процедуры инактивации вируса в суспензии.

Испытание активности и специфичности лиофилизованного инактивированного положительного, а также отрицательного контроля РИФ проводили с использованием ФИТЦ-глобулинов “ВНИИЗЖ”, “Centocor”, “Bio-Rad” и производства ВНИВИ. Полученные данные показали, что лиофилизованные положительный и отрицательный контроли могут быть использованы с целью проверки активности и специфичности антирабических ФИТЦ-глобулинов.

Разработанный набор препаратов для диагностики бешенства в РИФ на основе ФИТЦ-глобулина “ВНИИЗЖ” включает все компоненты, необходимые для постановки РИФ, что отличает его от других наборов, предназначенных для диагностики бешенства в этой реакции, выпускаемых отечественной и зарубежной биологической промышленностью. Данный набор используется в лаборатории малоизученных болезней ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» для диагностики бешенства с 2001 года. Всего за истекший период было исследовано около 800 проб головного мозга животных, подозреваемых в заражении бешенством. Более 30% из них оказались положительными. С использованием разработанного набора проводили предварительный отбор изолятов вируса бешенства для изучения их молекулярно-биологических характеристик, а также мониторинг бешенства в граничащих с Финляндией регионах России.

Изучение полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с использованием МКА. Для выполнения данного этапа работы было отобрано 154 полевых изолята вируса бешенства, полученных от 11 видов животных из 13 регионов России, а также Финляндии и Эстонии. Около 60% из них (93) были получены от диких животных. Более половины изолятов было

собрано от лисиц. Результаты определения антигенных вариантов собранных изолятов вируса бешенства с использованием МКА представлены в таблице 1.

Таблица 1.

**Определение антигенных вариантов изолятов вируса бешенства
с помощью МКА**

Антигенный вариант/Регион	Гено-тип	Реакция с МКА				
		W-239.17	W-187.5	W-187.11.2	MW-187.6.1	P-41
Собственные результаты						
I. Финляндия, Эстония, Россия	1	+	+	+	+	+
II. Эстония	1	+	-	+	+	-
III. Россия	1	+	+	+	+	-
IV. Россия	1	+	-	+	+	-
V. Россия	1	+	-	+	-	-
Данные, опубликованные в литературе						
Арктический ¹	1	+	+	+	+	-
Европейский лисий ²	1	+	+	+	+	-
Восточно-европейский ²	1	+	-	+	+	-
Lagos bat ^{3,4}	2	+	-	-	+	-
Mocola ^{3,4}	3	+	-	-	+	-
Duvenhage ^{3,4}	4	+	-	-	+	-
EBL1 ²	5	+	-	-	-	-
EBL2 ¹	6	+	-	-	+	-

¹Schneider. et al, 1985; ²Cox et al., 1992; ³Umoh et al, 1990; ⁴Mebatsion et al., 1992.

Из таблицы 1 следует, что по результатам изучения антигенных свойств все исследованные полевые изоляты вируса бешенства относятся к первому генотипу. Антигенный вариант I соответствует арктическому антигенному варианту, антигенные варианты III и IV соответствуют европейскому лисьему и восточно-европейскому антигенным вариантам, соответственно. Антигенные варианты II и V не соответствуют ни одному из ранее выделенных антигенных вариантов. Установлено, что в подавляющем большинстве случаев (около 70%) выявлялся антигенный вариант III, чаще среди лисиц, а также у собак, кошек и КРС. Остальные антигенные варианты выделялись значительно реже.

Географическая локализация антигенных вариантов показана на рисунке 1. Из представленных данных следует, что антигенный вариант I циркулирует,

главным образом, в северо-западных регионах России, а также в Финляндии и Эстонии. Однако к этому антигенному варианту относились и несколько изолятов из Курской области. Антигенный вариант II был выделен только на островах Эстонии, а III и IV – в центральных и в юго-западных регионах России. Изоляты, выделенные в Новосибирской области, были отнесены к антигенному варианту III. Антигенный вариант V был выделен только в Тверской области.



Фиксированные штаммы вируса бешенства по характеру реакции с МКА были разделены на 2 группы. В первую вошел штамм SAD B19, в другую группу – штаммы РВ-97, “ВНИИЗЖ”, “Овечий” и CVS.

Выявление генома вируса бешенства в ПЦР. Разработку ПЦР проводили исключительно для наработки ПЦР-продуктов с целью их секвенирования, однако изучали возможность использования данной реакции и для диагностических целей. Для постановки ПЦР использовали 2 пары праймсров, первая из которых амплифицирует фрагмент N-гена размером 360

н.о. Вторая пара амплифицирует фрагмент размером 260 н.о., расположенный на G-гене, и затрагивает псевдоген ψ (G-праймеры). Первый из указанных фрагментов локализуется в позиции 626-986 н.о., а второй – в позиции 4835-5095 н.о. (в соответствии с последовательностью штамма SAD B19) Результаты исследования некоторых полевых изолятов и фиксированных штаммов вируса бешенства в ПЦР представлены на рисунке 2.

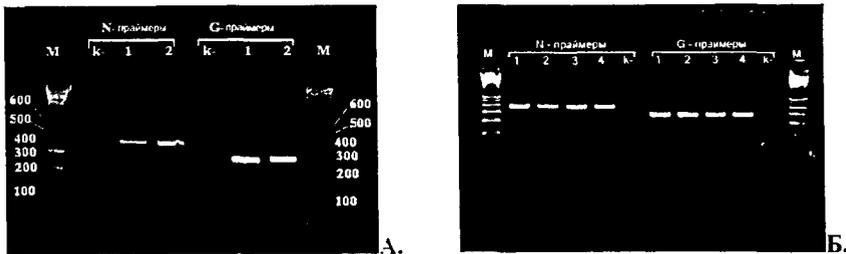


Рис. 2. Электрофореграмма полинуклеотидов, полученных методом ОТ-ПЦР. **А.** Изолят №96 (треки 1 N и G) и вакцинный штамм РВ-97 (треки 2 N и G). М – маркер. Цифрами вдоль трека маркера показан размер ПЦР-продукта. k - отрицательный контроль. **Б.** Изоляты №№ 1, 13, 18 и 85 (треки 1. 2. 3. 4 N и G. соответственно).

Как показано на рисунке 2, выбранные пары праймеров позволили амплифицировать фрагменты кДНК, имеющие размеры, соответствующие расчетным. С использованием РИФ и разработанного варианта ПЦР исследовали 17 полевых изолятов вируса бешенства, принадлежащих к 5 различным антигенным вариантам. Результаты ПЦР в 100% случаев совпадали с результатами РИФ, что свидетельствует о перспективности дальнейшей оптимизации и применения данного варианта реакции как дополнительного теста при диагностике бешенства.

Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ. С целью дальнейшей оценки изолятов вируса бешенства, полученных из различных регионов России, Финляндии и Эстонии, определяли нуклеотидную последовательность выбранных фрагментов N-, G-гена и ψ -региона. Полученные последовательности сравнивали как между собой, так и с последовательностями, опубликованными в EMBL. Результаты сравнения 24

полевых изолятов и трех вакцинных штаммов вируса бешенства по нуклеотидным последовательностям фрагмента N-гена представлены на рисунке 3.

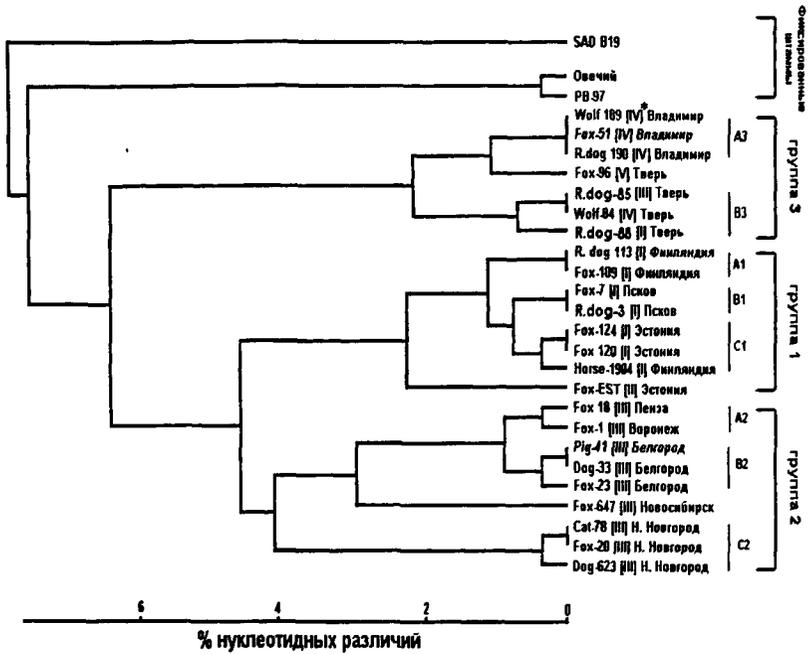


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая генетические отношения между вакцинными штаммами и полевыми изолятами вируса бешенства по фрагменту N-гена; *антигенный вариант данного изолята.

Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента N-гена показал, что изучаемые изоляты могут быть разделены на 3 группы. Распределение изолятов по группам в большинстве случаев коррелирует с их географическим происхождением, а также с антигенными вариантами, выявленными по реакции с МКА.

Группу 1 образуют изоляты, принадлежащие к антигенным вариантам I и II, выделенные в Финляндии, Псковской области и Эстонии. Уровень нуклеотидных различий между изолятами, образующими эту группу, составляет 0,6-0,9%. Изолят Fox-EST, выделенный в Эстонии и

представляющий II антигенный вариант, отличается от остальных изолятов данной группы на 1,5-1,8%.

Группу 2 образуют изоляты, по реакции с МКА отнесенные к антигенному варианту III. В нее входят изоляты, выделенные в Воронежской, Пензенской, Белгородской, Нижегородской и Новосибирской областях. Изолят "Фох-647", выделенный в Новосибирской области, отличается от остальных изолятов этой группы на 2,4%. Группу 3 образуют изоляты, выделенные во Владимирской (антигенный вариант IV) и Тверской областях (антигенный вариант I, III, IV и V). Уровень нуклеотидных различий между изолятами данной группы составляет 0,9-2,1%. Уровень нуклеотидных различий между группами 1, 2 и 3 составляет около 4,0-6,5%.

Вакцинный штамм SAD B19 отличается от штаммов "Овечий" и PB-97 на 7,5%. Уровень нуклеотидных различий изучаемого фрагмента N-гена штаммов SAD B19 и PB-97 от полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в России, составляет 5,4-7,5%.

Сравнительный анализ полученных нами нуклеотидных последовательностей фрагмента N-гена изолятов, выделенных на территории России, Финляндии и Эстонии и опубликованных в EMBL нуклеотидных последовательностей изолятов, выделенных в Европе, Азии и Африке, показал, что по уровню нуклеотидных различий их можно разделить на 6 групп. Три группы (1, 2 и 6) образованы изолятами, выделенными в различных регионах России. Группу 3 образуют изоляты, выделенные в Алжире, Эфиопии и Югославии. Четвертую группу образуют изоляты, выделенные в Финляндии, Эстонии и Псковской области. В группу 5 вошли 11 изолятов, которые были выделены во Франции, Эстонии, Германии, Польше и Боснии. Установлено, что анализируемые изоляты и штаммы отличаются друг от друга в пределах 0,3-9,3%. Вакцинные штаммы "Овечий" и PB-97 отличаются от вакцинных штаммов SAD B19, Ni-Ce, HEP-Flury более чем на 7%.

В связи с тем, что N-ген считается высококонсервативным, для решения задач молекулярной эпизоотологии используют более переменные участки генома, один из которых расположен в конце G-гена и захватывает ψ -регион

(N. Tordo et al., 1996). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента G-гена и ψ -региона 23 полевых изолятов и 3 вакцинных штаммов вируса бешенства представлен на рисунке 4.

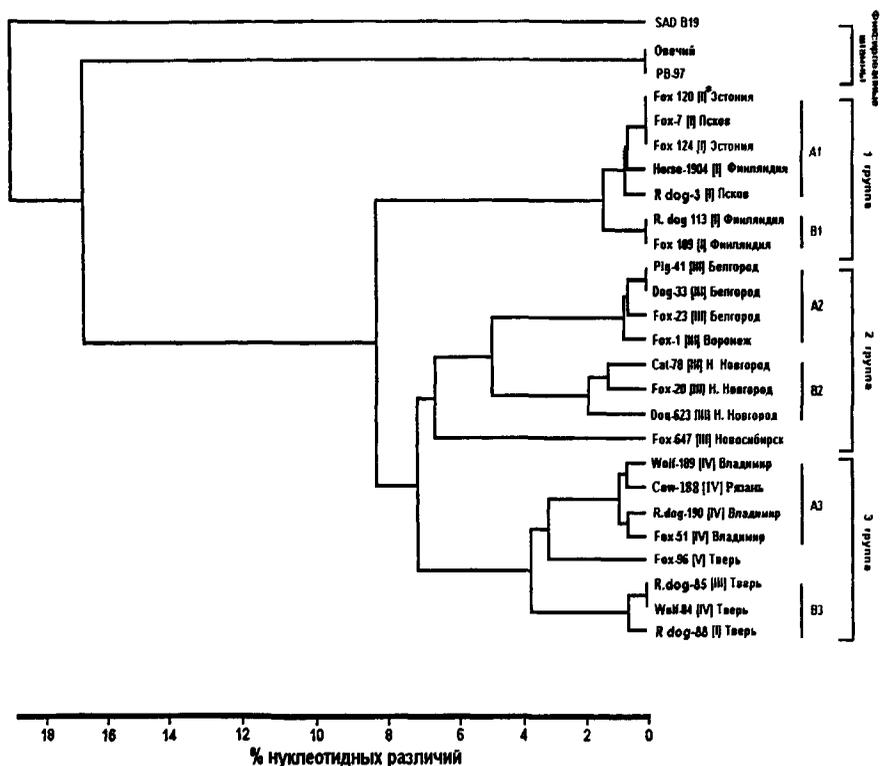


Рис. 4. Дендрограмма, отражающая генетические отношения между вакцинными штаммами и полевыми изолятами вируса бешенства по фрагменту G-гена и ψ -региона; *антигенный вариант данного изолята.

Анализ первичной структуры фрагмента G-гена и ψ -региона в пределах группы изолятов, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, позволяет выделить три группы. Распределение изолятов по группам, как правило, соответствовало антигенным вариантам, определенным по реакции с МКА, и по их географическому происхождению.

Группу 1 образуют изоляты, выделенные в Псковской области, Эстонии и Финляндии, принадлежащие к антигенному варианту I. Уровень нуклеотидных

различий между изолятами данной группы составляет около 1%. Группу 2 образуют изоляты, выделенные в Воронежской, Белгородской и Нижегородской областях и принадлежащие к антигенному варианту III. Уровень нуклеотидных различий между изолятами второй группы составляет около 4%. Изолят "Фох-647", выделенный в Новосибирской области, отличается от остальных изолятов этой группы приблизительно на 5%. Третья группа образована изолятами, выделенными во Владимирской, Рязанской (антигенный вариант IV) и Тверской областях (антигенный вариант I, III, IV и V). Изоляты, образующие группы 2 и 3, отличаются друг от друга на 5,5-6,7%, а от первой группы на 7%. Вакцинные штаммы "Овечий", РВ-97 и SAD B19 отличаются от полевых изолятов на 13-14,5%, а друг от друга на 19%.

Сравнительный анализ полученных нами нуклеотидных последовательностей фрагмента G-гена и ψ -региона изолятов, выделенных на территории России, Финляндии и Эстонии и опубликованных в EMBL. нуклеотидных последовательностей изолятов, выделенных в Европе, Азии, Африке, Северной Америке, показал, что по уровню нуклеотидных различий их можно разделить на 6 групп. В первую и вторую группы вошли изоляты, выделенные в Марокко, ЮАР и Зимбабве. Третью группу образуют изоляты, выделенные в Финляндии, Эстонии, Псковской области и Франции. Группа 4 образована изолятами, выделенными в различных регионах России, а также в Польше. Изоляты, выделенные от лисицы в Новосибирской области и от енотовидной собаки в Польше, отличаются от остальных изолятов четвертой группы на 6%. Пятая группа образована изолятами, выделенными во Владимирской и Тверской областях, а также в Венгрии. Шестую группу образуют изоляты, выделенные в США. Изоляты, выделенные в Иране, Югославии, Китае и на Мадагаскаре, не попали ни в одну из групп и отличаются от остальных анализируемых изолятов на 7,7-12%, 5,7-10%, 8,5-14% и 9-12%, соответственно.

Известно, что гликопротеин вируса бешенства является белком,

индуцирующим образование ВНА. В рамках данной работы было проведено нуклеотидное секвенирование G-гена вакцинного штамма PB-97.

Для получения ПЦР-продуктов и нуклеотидного секвенирования использовали праймеры, опубликованные N. Tordo et al. (1996), а также оригинальные праймеры, рассчитанные на основании результатов собственных исследований. Три пары праймеров амплифицировали продукты размером около 560, 1080 и 870 н.о. Из полученной последовательности взяли фрагмент длиной 1575 н.о. (ген гликопротеина) и сравнили его с опубликованными в EMBL нуклеотидными последовательностями G-гена некоторых вакцинных штаммов вируса бешенства (SAD B19, ERA, HEP-Flury, Ni-Ce, Nishigahara. RC-HL, SRV9 и Vnukovo-32).

На рисунке 5 представлена дендрограмма, отражающая генетические отношения между различными вакцинными штаммами и штаммом PB-97, установленные на основе структурной гомологии нуклеотидных последовательностей гена гликопротеина.

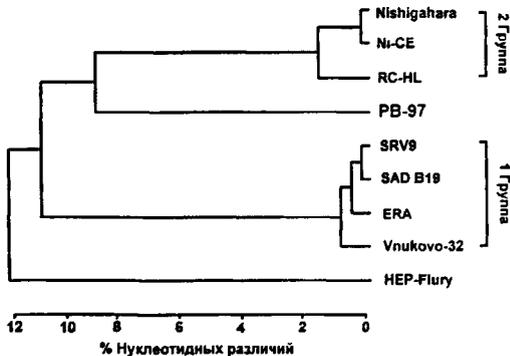


Рис. 5. Дендрограмма, отражающая генетические отличия между вакцинными штаммами, установленные на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена гликопротеина.

Из данных, представленных на рисунке 5, следует, что сравниваемые штаммы по уровню различий последовательности нуклеотидов формируют две группы. В первую из них входят штаммы SAD B19, SRV9, ERA и Vnukovo-32, во вторую группу – штаммы Ni-CE, RC-HL и Nishigahara. Штаммы PB-97 и

HEP-Flu9y не попадают ни в одну из групп. Штамм PB-97 отличается от штаммов первой группы на 9,5%, от штаммов, формирующих вторую группу, на 7,7%, от штамма HEP-Flu9y на 11,5%.

Анализ аминокислотных последовательностей, рассчитанных из последовательностей нуклеотидов, показал, что штамм PB-97 отличается от штаммов группы SAD (1 группа) и Nishigahara (2 группа) приблизительно на 10%. Отличие его от штамма HEP-Flu9y было несколько больше и составило 11,5%. Дальнейший анализ аминокислотных последовательностей проводили для штаммов SAD B19 и PB-97, поскольку первый широко используется для производства оральных антирабических вакцин в Европе, а второй – в России.

Нуклеотидные последовательности гена гликопротеина штаммов PB-97 и SAD B19 отличалась по 145 нуклеотидам, которые привели к замене 52 аминокислот (табл. 2).

Таблица 2.

Аминокислотные замены в гликопротеине штаммов PB-97 и SAD B19

Позиция аминокислоты	Аминокислотные замены		Позиция аминокислоты	Аминокислотные замены	
	SAD B19	PB-97		SAD B19	PB-97
11, 439	лейцин	фенилаланин	261	серин	аланин
13	валин	глицин	275	лизин	глутамин
15, 272, 488	пролин	серин	283	аргинин	гистидин
63	метионин	лейцин	337	фенилаланин	изолейцин
69	тирозин	гистидин	345, 422	аспараг. к-та	глутам. к-та
71	лейцин	серин	357	лейцин	валин
121	метионин	треонин	389	аспарагин	гистидин
132	гистидин	глутамин	415	валин	метионин
133	аргинин	глутамин	444	аспарагин	лизин
145, 239	лизин	аргинин	445	глутамин	лизин
158	валин	аланин	458	лизин	глутам. к-та
166, 297	аргинин	лизин	468, 478	треонин	изолейцин
181	валин	изолейцин	480	цистеин	аргинин
182, 466	аланин	треонин	486	серин	пролин
186	треонин	валин	491	гистидин	аргинин
204	лейцин	глутамин	492	аспарагин	серин
222, 367, 448, 497	глицин	глутам к-та	498	аргинин	метионин
223	серин	аргинин	509	изолейцин	фенилаланин
224, 499	глутам к-та	лизин	510	изолейцин	лизин
241	аланин	серин	516	гистидин	тирозин

Номера позиций обозначены в соответствии с последовательностью SAD B19

Из данных, представленных в таблице 2, следует, что из 52 замен аминокислот в 9 случаях отмечены повторяющиеся замены. Замены лейцина на фенилаланин, лизина на аргинин, аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на лизин, аланина на треонин, аспарагиновой кислоты на глутаминовую кислоту и треонина на изолейцин встречались по 2 раза, замены пролина на серин – 3 раза, замены глицина на глутаминовую кислоту – 4 раза.

Таким образом, выявлены значительные различия аминокислотных последовательностей гликопротеина штаммов PB-97 и SAD B19. Для выяснения роли установленных замен были изучены иммуногенные свойства вакцин “Синраб” и “Фуксорал”, созданных на основе упомянутых штаммов.

Испытание иммуногенности и безвредности оральной антирабической вакцины “Синраб”, изготовленной из штамма PB-97. Для решения поставленной задачи было проведено сравнительное изучение иммуногенности и безвредности оральных антирабических вакцин “Синраб” и “Фуксорал” на серебристо-черных лисицах, которых разделили на 5 групп. Животных, входящих в группы 1 и 2, иммунизировали одной дозой соответствующей вакцины (по 27 голов), в группах 3 и 4 – десятью дозами (по 8 голов), в пятой, контрольной группе, животных не вакцинировали (7 голов). Пробы крови для определения уровня антирабических вируснейтрализующих антител отбирали на 15, 30, 60 и 90 день после вакцинации. Пробы слюны отбирали на 3, 7, 15, 60 и 90 день после вакцинации. Результаты определения уровня ВНА в сыворотках крови выражали в международных единицах (МЕ). Анализ проб слюны проводили постановкой биопробы в культуре клеток МНА.

В соответствии с международными стандартами (OIE Manual, 2000), уровень ВНА, достаточный для защиты вакцинированных животных от инфицирования бешенством, должен составлять $\geq 0,5$ МЕ/мл. Процентное соотношение числа животных, содержащих достаточный для защиты уровень ВНА, в зависимости от срока, прошедшего после вакцинации, вида и дозировки вакцины представлено в таблице 3.

Таблица 3.

Процентное соотношение числа животных, содержащих достаточный для защиты уровень ВНА, в зависимости от вида используемой вакцины и дозировки

Вакцина	Дозировка (на 1 голову)	Сроки взятия проб после вакцинации (дни)			
		15	30	60	90
Синраб	×1	63%	90,9%	89,5%	78,9%
	×10	85,7%	100%	100%	80%
Фуксорал	×1	85%	100%	100%	100%
	×10	100%	100%	100%	100%
Контроль	0	0%	0%	0%	0%

Как видно из таблицы 3, при иммунизации животных одной дозой вакцины “Синраб” на 15 день после иммунизации достаточный для защиты уровень ВНА был выявлен у 63 % животных. На 30 день после вакцинации этот показатель в данной группе животных составил 91% и к 90 дню снизился до 79%. При вакцинации животных 10-ю дозами вакцины “Синраб” достаточный для защиты от заражения бешенством уровень ВНА наблюдали у 85,7% животных на 15 день после иммунизации, к 30 дню он достигал 100%, а к 90 дню снизился до 80%.

При иммунизации животных одной дозой вакцины “Фуксорал” на 15 день после вакцинации 85% животных имели достаточный для защиты уровень ВНА. Начиная с 30 дня и на всем протяжении опыта, необходимый для защиты от заражения бешенством уровень ВНА был выявлен у 100% животных этой группы. Вакцинация животных 10-ю дозами вакцины “Фуксорал” привела к образованию достаточного для защиты уровня ВНА у 100% животных на 15 день после иммунизации. Этот уровень сохранялся на протяжении всего опыта.

Установлено, что повышение уровня ВНА у животных при иммунизации вакциной “Синраб” продолжалось до 30 дня, а затем он снижался. Более высокие уровни ВНА отмечались при иммунизации вакциной “Фуксорал” и рост их продолжался до 60 дня после вакцинации.

Вирус бешенства в слюне иммунизированных животных обнаружить не удалось. Все исследованные в РИФ пробы головного мозга вакцинированных животных также показали отрицательный результат. Приведенные результаты

свидетельствуют о том, что вирусы бешенства штаммов РВ-97 и SAD B19 не имеют тенденции к накоплению в головном мозгу и выделению со слюной у лисиц, вакцинированных одной и 10-ю дозами.

Моделирование заражения животных бешенством проводили на базе Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ, г. Покров). С этой целью использовали изолят вируса бешенства R.dog-190, прошедший 1 пассаж на лисицах. В пределах срока наблюдения (30 дней) гибели среди вакцинированных животных отмечено не было. На 20 день после заражения погибло одно животное в контрольной группе. Для подтверждения специфичности гибели было проведено исследование головного мозга погибшего животного в РИФ, результат оказался положительным.

При проведении испытаний указанных вакцин на лисицах установлены различия в сроках образования ВНА и иммуногенности, но несмотря на это, обе вакцины являются эффективными и безопасными препаратами для профилактики бешенства.

4. Выводы

1. Разработан набор для диагностики бешенства в РИФ, с помощью которого создана коллекция, включающая 143 полевых изолята вируса бешенства, выделенных от 11 видов животных на территории 13 регионов России.

2. Установлено существование на территории России 4 антигенных вариантов вируса бешенства, в том числе одного ранее неизвестного.

3. Проведен анализ первичной структуры консервативного фрагмента N-гена (360 н.о.) 24 полевых изолятов и 2 аттенуированных штаммов, а также переменного фрагмента G-гена и ψ -региона (260 н.о.) 23 полевых изолятов и 2 аттенуированных штаммов вируса бешенства.

4. Показано распределение изолятов, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, на три группы, отличающиеся по фрагменту N-гена на 4-7%, по фрагменту G-гена и ψ -региона на 5,5-7,5%. Штамм РВ-97 отличается от

указанных выше изолятов по фрагменту N-гена на 5,5-7,5%, а по фрагменту G-гена и ψ -региона на 13-14,5%.

5. Определена нуклеотидная последовательность G-гена (1575 н.о.) и соответствующая ей аминокислотная последовательность гликопротеина аттенуированного штамма РВ-97 вируса бешенства. Установлено, что он отличается по аминокислотной последовательности от штаммов группы SAD (1 группа) и Nishigahara (2 группа) приблизительно на 10%. Отличие его от штамма НЕР-Flury было несколько больше и составило 11,5%.

6. Показано, что вакцина «Синраб», полученная на основе штамма РВ-97, обладает высокой иммуногенностью и индуцирует у лисиц образование вируснейтрализующих антител в титрах, достаточных для защиты 91% животных на 30 день после иммунизации.

7. Установлено, что штамм РВ-97 не имеет тенденции к персистенции в головном мозгу и выделению со слюной у лисиц, иммунизированных одной и 10-ю дозами вакцины.

5. Практические предложения

На основе результатов исследований подготовлены следующие документы:

1. «Методические указания по отбору проб мозга для диагностики бешенства и сывороток крови с целью определения титра антител», утвержденные руководителем Департамента ветеринарии Минсельхоза России 03.04.2001.
2. Комплект нормативно-технической документации на набор для диагностики бешенства методом иммунофлюоресценции: ТУ, временная инструкция, методические рекомендации, утвержденные директором ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» 20.11.2004;
3. «Методические указания по применению реакции подавления иммунофлюоресценции (РПИФ) для выявления антител к вирусу бешенства», утвержденные директором ФГУ ВНИИЗЖ 10.01.2003, которые могут использоваться для оценки иммуногенности антирабических вакцин.

Кроме того, полученные нуклеотидные последовательности консервативного фрагмента N-гена и варибельного фрагмента G-гена и ψ -

региона изолятов вируса бешенства, выделенных на территории России используются для идентификации и дифференциации вновь выделяемых изолятов вируса бешенства. Нуклеотидная последовательность G-гена и соответствующая ей аминокислотная последовательность гликопротеина штамма РВ-97 используется для сравнения ее с другими вакцинными штаммами и полевыми изолятами вируса бешенства.

Получены дополнительные результаты, указывающие на безвредность для лисиц вакцины “Синраб” производства ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

6. Список опубликованных научных работ

1. Метлин А.Е., Рыбаков С.С., Чепуркин А.В., Егоров А.А. Выявление антигена вируса бешенства в консервированных формалином пробах головного мозга мышей //Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2001. – С. 46-49.
2. Михалишин В.В., Рыбаков С.С., Домский И.А., Борисов А.В., Метлин А.Е., Чепуркин А.В., Егоров А.А., Рябоконт А.А. Испытание иммуногенности и безвредности вирусвакцины против бешенства орального применения //Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2001. – С. 33-36.
3. Пономарёв А.П., Назаров Н.А., Рыбаков С.С., Артамонова Т.Н., Михайлина Н.М., Метлин А.Е., Манин Б.Л., Гусева М.Н. Совершенствование метода очистки и концентрирования вируса бешенства //Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельда-Якоба и другие прионные болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2001. – С. 49-51.

4. Метлин А.Е., Рыбаков С.С., Чепуркин А.В., Егоров А.А. Диагностика бешенства с использованием консервированных формалином проб головного мозга //Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с.-х. животных и людей: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 162-164.
5. Назаров Н.А., Метлин А.Е., Рыбаков С.С., Михайлина Н.М., Пономарев А.П., Артамонова Т.Н., Чепуркин А.В. Сравнительная характеристика антител, полученных на разные антигены вируса бешенства //Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии с.-х. животных и людей: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2002. – С. 168-170.
6. Борисов А.В., Метлин А., Домский И.А., Михалишин В.В., Рыбаков С.С. Оценка эффективности иммунизации диких животных оральной антирабической вакциной //Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства: Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию ВНИИОЗ. – Киров, 2002. – С. 543-545.
7. Борисов А.В., Толокнов А.С., Метлин А.Е., Михалишин В.В., Рыбаков С.С. Испытание безопасности и эффективности вирусвакцины “Синраб” на видах мишенях //Уч. зап. Витебской ордена “Знак Почёта” гос. акад. вет. медицины: – Витебск, 2002. – Т. 38, Ч. 1. – С. 15-18.
8. Метлин А.Е., Рыбаков С.С., Груздев К.Н., Михалишин В.В., Чепуркин А.В., Михалишин Д.В., Борисов А.В. Сравнительное изучение иммуногенности и безвредности антирабических вакцин «Синраб» и «Фуксорал» //Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Матер. междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ВНИИЗЖ. – Владимир, 2003. – С. 466-469.
9. Назаров Н.А., Чепуркин А.В., Рыбаков С.С., Михайлина Н.М., Метлин А.Е. Диагностика бешенства методом твердофазного непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа //Актуальные проблемы

инфекционной патологии животных: Матер. междунар. науч. и
посвящ. 45-летию ВНИИЗЖ. – Владимир, 2003. – С. 218-222.

2005-4
49037

10. Назаров Н.А., Чепуркин А.В., Рыбаков С.С., Михайлина Н.М., Егоров А.А., Метлин А.Е. Разработка схемы лабораторной диагностики бешенства //Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Тр. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 45-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. – С. 153-157.

11. Metlin A.E., Cox J., Rybakov S.S., Huovilainen A., Grouzdev K.N., Neuvonen E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia //J. Vet. Med. B. – 2004. – V. 51. – P. 94-96.

12. Rybakov S.S., Metlin A.E., Grouzdev K.N., Neuvonen E. Comparative safety and potency testing of rabies vaccines “Sinrab” and “Fuchsoral” //International Conference on the Control of Infectious Animal Diseases by Vaccination: Programme and Abstracts Book. – Buenos Aires, 2004. – P. 80.