

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЖИВОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ДИКИХ ЖИВОТНЫХ НА МЫШАХ

В. А. Бабак, кандидат ветеринарных наук

А. А. Гусев, доктор ветеринарных наук, член-корреспондент РАН, профессор

И. А. Пунтус, младший научный сотрудник

А. С. Смаилова, младший научный сотрудник

ПХВ «НЦБ», Республика Казахстан; ветеринарных наук

Ключевые слова: мыши, иммуногенная активность, антирабическая вирус-вакцина.

Реферат. Представлены результаты альтернативных исследований иммуногенной активности живой антирабической вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных. Рассматривается методика оценки иммуногенности с использованием модели оральной иммунизации на мышах при экспериментальном заражении контрольным вирусом бешенства CVS в дозе 10–100 МЛД₅₀/0,03 мл. Однократно вводимая иммунизирующая доза для белых мышей массой 12–14 г составила 56,200 МЛД₅₀ при титрах ВНА от 1:6 до 1:16 (3,0–4,0 log²) и выше.

METHOD OF DETERMINING THE IMMUNOGENIC ACTIVITY OF LIVE VACCINE AGAINST RABIES IN WILD ANIMALS IN MICE.

V. A. Babak, Candidate of Veterinary Sciences

A. A. Gusev, Doctor of Veterinary Sciences, Corresponding member of RAS, Professor

I. A. Puntus, Junior Researcher

A. S. Smailova, Junior Researcher

PCV «NCB», Republic of Kazakhstan; veterinary Sciences

Key words: mice, immunogenic activity, rabies virus-vaccine.

Abstract. The results of alternative studies on the immunogenic activity of live rabies vaccines for oral immunization of wild carnivorous animals are presented. The method of evaluation of immunogenicity using a model of oral immunization in mice with experimental infection control rabies virus CVS in the dose of 10–100 MLD₅₀/0,03 ml. Once entered immunizing dose for white mice, weighing 12–14 g were 56.200 MLD₅₀, the titers of VNA ranged from 1:6 to 1:16 (3,0–4,0 log₂) and above.

Ветеринарные вакцины против бешенства содержат или живой вирус, аттенуированный для целевых животных (такой как Flury низкого пассажа на яйцах, Flury высокого пассажа на яйцах, Street-Alabama-Dufferin или Kelev), или вирус, инактивированный химическими или физическими средствами, или представляют собой рекомбинантные генно-инженерные вакцины. Вакцинный вирус культивируют в ткани ЦНС новорожденных животных (тканевые вакцины), в яйцах с развивающимся эмбрионом (эмбриональные) или в различных клеточных культурах (культуральные) [1–3].

Для каждого вида разрабатываемой вакцины на животных-мишенях следует определить продолжительность и напряжённость иммунитета, выработанного в результате применения биопрепарата. Относительно живых вирусных вакцин должно быть установлено минимальное количество вируса, на введение которого вырабатывается адекватный иммунный ответ. Кроме того, вакцины обоих типов подвергают тестированию на безвредность и отсутствие токсичности. Касаемо живых вирусных вакцин, которые производят для пероральной вакцинации диких животных, необходимо доказывать их безопасность и эффективность на животных-мишенях и безопасность на животных, не являющихся целевыми видами (грызуны и другие дикие животные) [4–7].

По литературным данным, существуют различные методы определения иммуногенной активности антирабических вакцин [1–4]. Среди них можно отметить исследование сыворотки объемным методом Национальных институтов здравоохранения США (НИН), реакцию вируснейтрализации в культуре клеток (FAVN) и быструю реакцию подавления флуоресцирующего фокуса для определения нейтрализующих вирус бешенства антител (RFFIT) – предписанные для международной торговли тесты; реакцию вируснейтрализации на мышах, иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием моноклональных антител к протеину G и некоторые другие. Результаты выражаются в международных единицах или эквивалентных единицах относительно международной стандартной антисыворотки.

Кроме указанных методик, на практике используют метод прямого заражения иммунизированных против бешенства плотоядных животных с использованием уличного (или стандартного контрольного) вируса бешенства против 5–50 или 10–100 МЛД₅₀. Данная методика определения инфекционной активности связана с техническими сложностями: приобретение, содержание, иммунизация, заражение и содержание зараженных животных в течение всего периода наблюдения.

Большинство рассматриваемых методик определения иммуногенной активности при разработке были направлены на определение антител в сыворотках крови от парентерально иммунизированных животных (с использованием различных инаktivированных антирабических вакцин). Применение этих методов создает ряд неудобств и ошибок при проведении исследований, а также связано с вышеописанными техническими сложностями.

Для контроля поствакцинального иммунитета у орально иммунизированных живыми вакцинами диких плотоядных животных ВОЗ и МЭБ рекомендуют реакцию вируснейтрализации в культуре клеток (реакция вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами – FAVN) [2, 3]. Для постановки данной реакции необходимо получить опытную сыворотку крови в максимально стерильных условиях, так как она будет использована для работы с культурой клеток, а также иметь стандартизированные питательные среды, реактивы, контрольные штаммы и референтные стандартные сыворотки.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования была попытка разработки возможной лабораторной модели определения иммуногенной активности (ИА) живой антирабической вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных на лабораторных восприимчивых животных.

Материалом для исследований служили опытные серии приманок с антирабической вирус-вакциной, содержащие аттенуированный фиксированный вирус бешенства Rabies virus fix, штамм BGCM–V01. Биологический материал аттенуированного штамма вируса BGCM–V01 положен в основу конструирования «Вакцины антирабической в блистер-приманках для пероральной иммунизации диких плотоядных животных».

Накопление вакцинного вируса проводили в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 (cl-13) в роллерном монослое и глубинным суспензионным способом в лабораторном биореакторе Biostat-B.

Титр инфекционной активности полученного вируса проверяли методом титрования на мышатах при интродеребральном заражении. Активность вируса составляла от 6,25 до 7,50 lg МЛД₅₀/мл.

Для экспериментального контрольного заражения нами использовался фиксированный вирус бешенства штамма Challenge Virus Standard (CVS) в виде мозговой культуры, полученный в 1971 г. из лаборатории профилактики бешенства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Вирус CVS был адаптирован к культуре клеток РЭК. Титр инфекционной активности вируса, использованного в экспериментах, составляет 7,0 lg МЛД₅₀/мл.

Для исследования нами подобраны клинически здоровые нелинейные белые мыши из вивария ТОО BiotronGroop массой 12–15 г, при этом была поставлена задача определения иммунизирующей дозы для используемых мышей (и количества мышинных минимальных иммунизирующих доз, содержащихся в одной оральной приманке для плотоядных животных).

Расчет вели от базового варианта иммунизации диких плотоядных животных: на среднестатистическую лисицу массой 5–6 кг для создания напряженного иммунитета должно быть введено орально 1–2 млн МЛД₅₀, и созданный иммунитет должен противостоять 10–100 МЛД₅₀ контрольного вируса CVS.

В пересчете на живую массу лабораторных подопытных животных и с учетом физиологических данных они должны получить орально 5,620–56,200 МЛД₅₀/гол. Иммунизировали мышей однократно

орально в дозе вируса 5620–56200 МЛД в объеме 0,03 мл из шприца, не травмируя слизистую оболочку ротовой полости.

Через 21 день иммунизированных мышей подвергали экспериментальному контрольному заражению стандартом вируса CVS в дозе 10–100 МЛД₅₀/0,03 мл. Параллельно стандартный вирус в дозе 10–100 МЛД₅₀/0,03 мл вводили неиммунной группе контроля. Кроме того, провели уточняющую титрацию заражающего материала, по итогам которой установили, что опытные и контрольные животные получили при заражении 31,6 МЛД₅₀/0,03 мл.

Напряженность сформировавшегося иммунитета определяли по выживаемости мышей в течение 14 суток после экспериментального контрольного заражения.

За сутки до контрольного заражения (20-й день) у иммунизированных животных брали кровь для определения титров антител в реакции вируснейтрализации на культуре клеток ВНК-21 (cl-13) с постоянной дозой контрольного вируса CVS в дозе 10–100 МЛД₅₀/0,03 мл (фактическая доза 31,6 МЛД₅₀/0,03 мл). Реакцию нейтрализации ставили в 96-луночных планшетах, окрашивание проводили флуоресцеин изотиоцианатом антирабического конъюгата через 48 ч инкубации по стандартной методике. Конечный титр сывороточной нейтрализации определяется как фактор наивысшего разведения сыворотки, при котором 50 % наблюдаемых микроскопических полей содержат одну или более инфицированных клеток. Результат РВН оценивали качественным образом: отсутствие флуоресцирующих клеток – в отношении лунки регистрируется минусовой учёт; наличие флуоресцирующих клеток (одна клетка или более) – в отношении лунки регистрируется плюсовой учёт.

Стандартная процедура постановки реакции вируснейтрализации с флуоресцирующими антителами на культуре клеток предписана ВОЗ и МЭБ для международной торговли [2–4].

Животных для исследований разделяли на три опытные группы по 6 голов и одну контрольную с трехкратной повторностью каждого опыта.

В серия опыта № 1 мыши 1-й опытной группы получали орально 562,000 МЛД₅₀, 2-й – 56,200 МЛД₅₀, 3-й – 5,620 МЛД₅₀.

Через 20 суток после экспериментальной иммунизации провели отбор крови у опытных и контрольных животных. Данные экспериментов оценки иммуногенной активности по уровню вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных животных в реакции вируснейтрализации представлены в табл. 1.

Таблица 1

Титры антител у иммунизированных орально опытных животных

Серия эксперимента	Доза вируса для иммунизации и выживаемость мышей			Отрицательный контроль
	562,000 МЛД ₅₀	56,200 МЛД ₅₀	5,620 МЛД ₅₀	
Серия № 1	1:20	1:16	1:8	0
Серия № 2	1:16	1:10	1:6	0
Серия № 3	-	1:12	1:12	0
Среднее значение в группе	1:18	1:12,7	8,7	0
Значение log ₂	4,17	3,67	3,12	0

Результаты эксперимента свидетельствуют о формировании иммунного ответа при экспериментальной оральной иммунизации на уровне от 1:6 до 1:16 (3,0–4,0 log₂) и выше. Прослеживается также зависимость средних титров вируснейтрализующих антител и дозы вируса, полученной при иммунизации, – от 1:8,7 до 1:18 при дозе 5,620 и 562,000 МЛД₅₀ соответственно. По литературным данным, полученные средние значения ВНА в экспериментальных группах обеспечивают защиту от заражения вирусом бешенства [5–7]. Эти данные были подтверждены на втором этапе исследовательской работы.

Через 21 день после иммунизации все три опытные и контрольная группы были заражены интрацеребрально контрольным стандартным вирусом CVS в дозе 31,6 МЛД₅₀. Наблюдение за животными вели в течении 14 дней.

В первой серии опытов получены следующие результаты: в 1-й и 2-й группах все зараженные мыши выжили, в 3-й группе 83,3 % животных выжили при 100 %-м падеже животных в контрольной неиммунизированной группе.

Во второй серии опытов группы мышей были иммунизированы и заражены по той же схеме. По итогам наблюдения в 1-й и 2-й группах 100 % животных выжили, в 3-й – 66,6 %, а в контрольной группе отмечалась 100%-я гибель животных.

В третьей серии экспериментов с целью уточнения и расширения результатов исследования 1-ю группу иммунизировали 56,200 МЛД₅₀, 2-ю – 5,620 МЛД₅₀, 3-ю – 562 МЛД₅₀, а через 20 дней провели контрольное заражение вирусом CVS. Через 14 дней наблюдения после заражения получены следующие результаты: в 1-й и 2-й группах – 100 % животных выжили, в 3-й все мыши пали, а в контрольной группе пало 66,6 % мышей. По нашему мнению, 100%-я гибель мышей в 3-й группе и выживаемость в контрольной группе связаны с технической погрешностью при интрацеребральном заражении животных.

Итоговые данные проведенных экспериментов по иммунизации мышей и их выживаемости приведены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты выживаемости опытных животных после контрольного заражения, %

Серия эксперимента	Доза вируса для иммунизации				Контроль, CVS 31,6 МЛД ₅₀
	562,000 МЛД ₅₀	56,200 МЛД ₅₀	5,620 МЛД ₅₀	562 МЛД ₅₀	
Серия № 1	100	100	83,3	-	0
Серия № 2	100	100	66,6	-	0
Серия № 3	-	100	100	0 %	33,4
Среднее значение	100 %	100 %	83,33 %	-	-

Из мозга павших животных подготовлены мазки-отпечатки и обработаны флуоресцирующим глобулином для обнаружения антигена вируса бешенства при люминесцентной микроскопии. Из 12 мазков-отпечатков в 10 было обнаружено характерное для антигена вируса бешенства свечение (тельца Негри), что подтверждает гибель мышей от лабораторного заражения контрольным штаммом вируса бешенства (рисунок).



Характерное свечение вирусных частиц (тельца Негри) при обработке флуоресцирующим конъюгатом (РИФ), люминесцентная микроскопия

Таким образом, определена однократно вводимая иммунизирующая доза 56,200 MLD для белых мышей массой 12–14 г, создающая защиту против 10–100 МЛД₅₀/0,03 мл контрольного вируса CVS и являющаяся достаточной для образования защитного уровня вируснейтрализующих антител. Следует также отметить, что иммунизирующая доза 5,620 MLD защищает от 66,6 до 100 % животных, что является удовлетворительным результатом.

Определенная нами оральная иммунизирующая доза для мышей (56200–5620 МЛД) коррелирует с дозой вируса для диких плотоядных животных (1–2 млн МЛД), что свидетельствует об эффективности лабораторной модели определения иммуногенной активности оральной антирабической вакцины. Данные остальных групп иммунизации животных могут быть использованы в научных целях, потому что по современным требованиям, определения безвредности при различных путях введения носят рекомендательный характер.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Определение иммуногенности антирабической вакцины на лабораторной модели позволило подобрать иммунизирующую мышиную дозу вакцины, которая защищает 100% животных при экспериментальном заражении контрольным вирусом бешенства CVS в дозе $10-100 \text{ МЛД}_{50}/0,03 \text{ мл}$. Однократно вводимая иммунизирующая доза для белых мышей массой 12–14 г составила $56,200 \text{ МЛД}_{50}$.
2. Полученные при экспериментальной иммунизации мышей титры ВНА от 1:8 до 1:16 ($3,0-4,0 \log_2$) и выше свидетельствуют о напряженном иммунитете против бешенства.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Методы лабораторных исследований по бешенству*. – Женева, ВОЗ, 1975. – 353 с.
2. *Руководство МЭБ по диагностическим тестам и вакцинам*. Гл. 2.2.5: Бешенство. – 2004. – Т. 1.
3. *OIE: Rabies*. // *OIE Terrestrial Manual*. – OIE, Paris. 2008. – Chapt. 2.1.13. – P. 304–323.
4. *Smith J.S., Yager P.A., Baer G.M.* A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody // *Laboratory techniques in rabies*, 4-th ed. / ed. F. X. Meslin, M. M. Kaplan, H. Kaprowski. – Geneva: World Health Organization, 1996. – P. 233–238.
5. *Борисов А. В.* Продолжительность иммунитета у лис при оральной иммунизации против бешенства вирус-вакциной «Синраб» // *Нейроинфекции: бешенство, ГЭ КРС, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: материалы междунар. науч.-практ. конф.*, 30–31 мая 2001 г., ВНИИВВиМ. – Покров, 2001. – С. 33–34.
6. *Гришок Л.П., Падалка О.В., Троценко З.Р.* Пероральна імунізація диких м'ясоїдних проти сказу // *Здоровье животных и лекарства*. – 2004. – С. 10–12.
7. *Испытание иммуногенности и безвредности вирус-вакцины против бешенства орального применения* / В. В. Михалишин [и др.] // *Нейроинфекции: бешенство, ГЭ КРС, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: материалы междунар. науч.-практ. конф.*, 30–31 мая 2001 г., ВНИИВВиМ. – Покров, 2001. – С. 34–36.

REFERENCES

1. *Methods of laboratory research on rabies*. – Geneva, WHO, 1975. – 353 p.
2. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines*. Ch. 2.2.5: Rabies. – 2004. – T. 1.
3. *OIE: Rabies*. // *OIE Terrestrial Manual*. – OIE, Paris. 2008. – Chapt. 2.1.13. – P. 304–323.
4. *Smith, J.S., Yager, P.A., Baer, G.M.* A fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody // *Laboratory techniques in rabies*, 4-th ed. / ed. F. X. Meslin, M. M. Kaplan, H. Kaprowski. – Geneva: World Health Organization, 1996. – P. 233–238.
5. *Borisov A. V.* The duration of immunity in foxes during oral immunization against rabies with the virus Sinrab // *Neuroinfections: rabies, Bovine EG, listeriosis, Aujeszky's disease, Teschen's disease: materials of the Intern. scientific-practical Conf.*, May 30–31, 2001, VNIIVViM. – Pokrov, 2001. – P. 33–34.
6. *Grishok, L.P., Padalka, O.V., Trotsenko, Z. R.* Peroral imunizatsiya wild m'yashoydnyh protiv skaz // *Animal Health and Medication*. – 2004. p. 10–12.
7. *Testing the immunogenicity and safety of a virus vaccine against oral rabies* / V. V. Mikhalishin [et al.] // *Neuroinfections: rabies, Bovine EG, listeriosis, Aujeszky's disease, Teschen's disease: materials of the Intern. scientific-practical Conf.*, May 30–31, 2001, VNIIVViM. – Pokrov, 2001. – P. 34–36.