

АННОТАЦИЯ

диссертационной работе Абишевой Айгерим Кенжебаевны, подготовленной на тему «Технология изготовления культурной вакцины против ринопневмонии лошадей» на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D120100 – «Ветеринарная медицина»

1. Актуальность темы исследования.

В Республике Казахстан коневодство традиционно относится к приоритетным отраслям животноводства и в настоящее время находится на новом качественном этапе развития. В стране активно разводятся высокоценные племенные лошади, увеличивается поголовье животных с улучшенными породными и продуктивными характеристиками, что обуславливает необходимость обеспечения их эпизоотического благополучия.

Для увеличения численности поголовья лошадей и наращивания объёмов производства продукции коневодства первостепенное значение имеют меры, направленные на устранение факторов, сдерживающих развитие отрасли, прежде всего инфекционных заболеваний, среди которых особое место занимает ринопневмония лошадей.

Ринопневмония лошадей является высококонтагиозным вирусным заболеванием, характеризующимся абортами у кобыл во второй половине жеребости и острыми воспалительными процессами дыхательных путей у молодняка. К заболеванию восприимчивы лошади всех пород, пола и возраста, при этом наибольшую чувствительность проявляет молодняк. Чистокровные племенные лошади болеют чаще, тогда как местные породы отличаются сравнительно более высокой устойчивостью. Заболеванию также подвержены ослы, мулы и пони.

Источником возбудителя инфекции являются больные животные, лошади в инкубационном периоде и вирусоносители. Вирус ринопневмонии содержится в крови и носовых истечениях больных лошадей и распространяется аэрогенным путём при чихании. У жеребых кобыл вирус в значительном количестве накапливается в плаценте и при abortе выделяется во внешнюю среду; abortивный плод, послед и плацента являются основными факторами передачи инфекции. Возможность передачи вируса со спермой жеребца окончательно не доказана.

Заболевание широко распространено в странах Америки, Европы, СНГ, в том числе на территории Республики Казахстан, и наносит значительный экономический ущерб хозяйствующим субъектам, обусловленный повышением падежа жеребят, потерями племенного поголовья и затратами на проведение ветеринарно-санитарных и противоэпизоотических мероприятий.

При наличии в хозяйстве жеребых кобыл ринопневмония может вызывать массовые abortы. Респираторная форма заболевания у жеребят и молодняка

проявляется преимущественно поражением верхних дыхательных путей и при благоприятных условиях содержания протекает относительно легко. У взрослых лошадей данная форма заболевания встречается реже вследствие сформировавшегося естественного иммунитета. В неблагополучных хозяйствах заболевание может приводить к абортам у до 90 % кобыл и сохраняться в течение 8–10 месяцев.

В связи с высокой контагиозностью ринопневмонии профилактика заболевания основывается на строгом соблюдении общих и специальных противозооотических мероприятий, включая запрет ввоза лошадей из неблагополучных хозяйств и пунктов, где в течение последних двух месяцев регистрировались аборт, а также обязательное содержание вновь поступивших животных на профилактическом карантине сроком не менее 30 дней.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящих исследований являлась разработка технологии создания вирусной вакцины против ринопневмонии лошадей. В результате проведенных исследований были изготовлены экспериментальные образцы сухой вирусной вакцины, полученной на культуре клеток, и изучены её иммунобиологические свойства.

2. Цель диссертационного исследования:

Целью диссертационного исследования является изучение культуральных и иммуногенных свойств возбудителя ринопневмонии лошадей и разработка технологии изготовления вакцины против данного заболевания.

3. Задачи исследования:

- Провести эпизоотологическое исследование по ринопневмонии лошадей;
- Изучить чувствительность вируса ринопневмонии лошадей путем пассирования на различных первичных и постоянных клеточных культурах;
- Адаптировать вирус ринопневмонии лошадей к активному размножению в выбранной клеточной культуре путем непрерывного пассирования и подобрать оптимальный режим культивирования;
- Изготовить экспериментальные образцы сухой вирусвакцины против ринопневмонии лошадей и испытать их иммунобиологические свойства;
- Разработать рекомендации по применению вирусвакцины для профилактики ринопневмонии лошадей в ветеринарной практике Республики Казахстан.

4. Методы исследования:

Диссертационная работа выполнена в 2018–2021 гг. на кафедре «Биологическая безопасность» Казахский национальный аграрный университет, при этом экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории научно-производственного центра ТОО «ДиаВак-АБН».

Эпизоотологическое исследование по ринопневмонии лошадей на территории Республики Казахстан выполнено на основе статистических данных Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан за период с 2011 по 2022 годы.

В качестве объекта исследования использовали вирусный штамм «АК-2011», выделенный из патологического материала, полученного от абортированного плода лошади, больной ринопневмонией.

Биологическую активность вируса ринопневмонии лошадей (жизнеспособность штамма «АК-2011» — $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$) определяли в различных культурах клеток: культуре клеток трахеи телёнка, постоянных культурах клеток почки телёнка, почки овцы, почки крупного рогатого скота, почки зелёной мартышки, почки сирийского хомяка, а также в первичной трипсинизированной культуре почки лошади, выращенной в пробирках и матрасах.

Пассирование вируса осуществляли методом последовательных заражений клеточных культур. Для этого из сосудов с монослоем удаляли ростовую питательную среду, вносили вирусную суспензию в соответствующей дозе и при лёгком покачивании обеспечивали её адсорбцию на поверхности монослоя при температуре 37°C в течение 1 часа. После удаления неадсорбированного вируса вносили поддерживающую питательную среду и продолжали культивирование при температуре 37°C .

Сбор вирусной массы проводили при чётком проявлении цитопатогенного эффекта по монослою либо в определённые сроки после заражения, в зависимости от цели эксперимента. Для этого инфицированные клеточные культуры замораживали при температуре -20°C , оттаивали при комнатной температуре, интенсивно встряхивали, разливали по флаконам объёмом 0,5 л (по 200–300 мл) и хранили в замороженном состоянии при температуре -20°C до использования в дальнейших исследованиях.

Титр вируса в культуральной жидкости определяли методом титрования на первичной трипсинизированной культуре почки лошади либо на пробирочной культуре клеток трахеи телёнка. Для этого готовили десятикратные разведения исследуемой вирусной суспензии (10^{-1} – 10^{-7}) на поддерживающей питательной среде и каждое разведение в объёме $1,0 \text{ см}^3$ вносили в 4–6 пробирочных культур клеток.

Цитопатогенную активность вируса оценивали по степени выраженности цитопатогенного эффекта, срокам его появления и скорости развития цитопатических изменений, а также по титру накопленного вируса. Все культуры ежедневно исследовали при малом увеличении микроскопа и сравнивали с контролем незаражённых культур. Расчёт титра вируса проводили методом Рида–Мюнха.

Для подтверждения молекулярно-генетических свойств вирусного штамма «АК-2011» выполнен ПЦР-анализ. Выделение вирусной ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора QIAGEN, амплификацию ДНК проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 9700.

Реакцию амплификации проводили в объёме 50 мкл, включая 5 мкл $10\times$ ПЦР-буфера (Qiagen, USA), $1 \mu\text{L}$ 10 mM dNTP (NEB, USA), $0,5 \mu\text{L}$ ДНК (100

ng/ μ L), 1 μ L праймера seeH-F 5'-AGC ATG ATT CTA ACT TAA TTG AAG CCG -3' (20 pmol/ μ L), seeH-R 5'-TAG CAT GCT ATT AAA GTC TCC ATT GCC-3' и 0.25 μ L (1.25 Units) Taq DNA-полимеразы (Qiagen, USA). Условия амплификации: 95°C – 5 мин; 20 циклов: 95°C – 20 с, touchdown 60°C (-0,5) – 20 с, 72°C – 30 с; 20 циклов: 95°C – 20 с, 50°C – 20 с, 72°C – 30 с; 72°C – 7 мин.

Секвенирование проводили на секвенаторе нового поколения «MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent v. 3 (Illumina, США).

Биоинформатический анализ данных секвенирования выполняли с использованием компьютерной программы Geneious 11.0 (Biomatters, Новая Зеландия).

Выравнивание последовательностей нуклеотидов и филогенетический анализ генов с известными последовательностями из GenBank выполняли в программе MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия при 500 выборках, модель GTR.

Апробацию разработанной вакцины проводили по следующим показателям: внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей и плесени, отсутствие трещин флаконов, прочность пробки и правильность маркировки, наличие вакуума в препарате, значение pH, время и концентрация ресуспендирования, массовая доля влаги, стерильность, биологическая активность, безвредность на кроликах и белых мышах, а также иммуногенность вирусвакцины у кроликов и лошадей.

Уровень специфических антител к возбудителю ринопневмонии лошадей определяли в реакции связывания комплемента и методом иммуноферментного анализа согласно утвержденной инструкции.

5. Основные положения выносимые на защиту диссертации:

- Проанализирована эпизоотическая ситуация по ринопневмонии лошадей на территории Республики Казахстан.

- В результате проведённых экспериментальных исследований изучены основные биологические и молекулярно-генетические свойства возбудителя; получен авирулентный штамм вируса ринопневмонии лошадей «АК-2011», перспективный в качестве кандидата для разработки вакцины против данного заболевания.

- Путём последовательного пассажирования вируса ринопневмонии лошадей в различных первичных и перевиваемых культурах клеток изучена его чувствительность; осуществлена адаптация вируса к активной репродукции в выбранной клеточной культуре, а также подобран оптимальный режим культивирования, обеспечивающий получение стабильно высокоактивной вирусной массы.

- Разработаны экспериментальные образцы сухой вирусной вакцины против ринопневмонии лошадей и изучены их иммунобиологические свойства.

- Разработаны рекомендации по применению вирусной вакцины против ринопневмонии лошадей для профилактики заболевания в ветеринарной практике Республики Казахстан и предложены к внедрению в производство.

6. Описание основных результатов исследования

Анализ эпизоотологических данных показывает рост показателей распространения ринопневмонии лошадей в 2011–2022 гг. В этот период неблагополучными по ринопневмонии лошадей были 10 областей Республики: Актюбинская, Жамбылская, Алматинская, Восточно-Казахстанская, Северо-Казахстанская, Атырауская, Карагандинская, Костанайская, Акмолинская и Павлодарская области. Западно-Казахстанская, Мангистауская, Кызылординская, Улытауская, Жетысуская, Абайская и Туркестанская области считаются благополучными по ринопневмонии лошадей: на их территории в 2011–2022 гг. случаи заболевания не регистрировались.

По геномным характеристикам вирусного штамма «АК-2011» вирус был на 99,9% сходен со штаммом RacL11, описанным в Германии в 1963 году.

Геном референсного штамма RacL11 состоял из 147 469 нуклеотидов, тогда как в геноме вируса ринопневмонии в области, кодирующей белок ORF67, были выявлены ряд делеций. Предполагается, что указанные делеции могут быть искусственно введены для аттенуации дикого штамма в вакцинных целях.

Установлено, что вирус, выделенный на территории Казахстана, по гену ORF68, широко используемому для определения эволюционных взаимосвязей, филогенетически наиболее близок к штаммам Т-953 и 2222-03, выделенным соответственно в США и Австралии. Эти данные свидетельствуют о тесной генетической связи исследованного штамма с вирусными изолятами, циркулирующими на международном уровне. Проведен скрининг наиболее чувствительных первичных и постоянных клеточных культур, способных обеспечивать непрерывную репликацию вируса ринопневмонии: ТТ, ПТ-80, ПО, ДВК, VERO и ВНК-21. При отработке оптимальных условий культивирования вируса инкубация при 37°C в течение 2–3 суток и изменение инфекционной дозы от 0,01 до 1,0 ТЦД₅₀/см³ обеспечили высокое накопление вируса в культуре ТТ. Титр вируса в культуре ТТ постепенно возрастал начиная с 1-го пассажа и достигал 6,00 lg ТЦД₅₀/см³, после чего стабильно сохранялся на высоком уровне. Наиболее активный вирусный материал получен именно в культуре ТТ, в связи с чем данная культура охарактеризована как наиболее чувствительная и оптимальная репликационная среда для вируса.

7. Обоснование новизны и значимости полученных данных

Ринопневмония лошадей регистрируется в стране в частных и коневодческих хозяйствах. В настоящее время отмечается тенденция к постепенному росту ввоза лошадей из регионов России, стран СНГ и ряда европейских государств. При этом сохраняется риск заноса ринопневмонии лошадей из неблагополучных стран. Увеличение численности лошадей и

развитие импорта из соседних стран требуют усиления контроля эпизоотической ситуации по ринопневмонии.

Результаты экспериментов показали, что среди испытанных клеточных культур для штамма вируса ринопневмонии лошадей «АК-2011» культура ТТ оказалась наиболее чувствительной и единственной системой, обеспечившей высокий титр. Репликация вируса в данной культуре оставалась стабильной при проведении десяти последовательных пассировок.

Проведенные исследования показали, что для получения культуральной вирусосодержащей жидкости с инфекционной активностью производственного штамма вируса ринопневмонии лошадей «АК-2011» ($5,75 \pm 6,00$) Ig ТЦЭ₅₀/см³ важны следующие условия:

- Инфекционная доза должна находиться в пределах 0,1–0,5 ТЦЭ₅₀/мл;
- Концентрация клеточной культуры ТТ должна составлять 150–200 тыс. кл/мл;
- При этих условиях монослой формируется в течение 40–72 часов, и именно в этот период определяется наивысший титр вируса – 5,25–6,0 Ig ТЦЭ₅₀/мл.

В рамках данной работы планировалось изготовление опытных образцов вирусвакцины, отработка основных технологических стадий ее производства на промышленном уровне и комплексная оценка иммуногенности и безопасности готового продукта.

Технологический процесс приготовления вакцины состоял из двух этапов:

I - получение матричной серии вируса, II - получение производственной серии вакцины.

Иммуногенность – способность вакцины вызывать иммунный ответ в организме. Время начала иммунитета – появление иммунного ответа через определенный промежуток времени после вакцинации; данный показатель характеризует быстроту вакцинного эффекта.

После изучения биологических свойств возбудителя приступили к разработке вакцины против ринопневмонии лошадей и далее проводили апробационные испытания под названием «RinoVac».

Качество экспериментальных серий разработанной вакцины против ринопневмонии лошадей оценивали по следующим показателям: бактериальная контаминация (наличие/отсутствие бактериального загрязнения в составе вакцины), грибковая и микоплазменная контаминация, стерильность, безвредность и ареактогенность.

Применение вирусвакцины внутримышечно в объеме 2 см³ способствует усилению иммунного ответа. Испытательным животным ревакцинацию (повторное введение) проводили через 90 дней с целью усиления первичного иммунного ответа и обеспечения длительной защиты, что способствует повышению иммуногенности вакцины.

8. Соответствие направлениям научного развития или государственным программам:

Диссертационная работа соответствует приоритетным направлениям усиления мер по профилактике заболеваний скота, совершенствования системы вакцинации и диагностики, обеспечения безопасности продукции животноводства и развития ветеринарной биотехнологии.

На основании Закона Республики Казахстан от 4 декабря 2015 года «О государственных закупках» (далее - Закон) и итогов государственных закупок способом «Аукцион (с 2022)» от 2024-04-24 года № 11983185-1, заключили настоящий договор о государственных закупках товаров.

9. Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 научных трудов, в том числе 1 статья в журнале *Transboundary and Emerging Diseases*, индексируемом в базе Scopus (квартиль Q1, процентиль 99), 3 статьи — в научных журналах, рекомендованных Комитет по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования МНВО РК, а также 4 публикации — в материалах международных научных конференций, конгрессов и симпозиумов.

10. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах компьютерного текста, содержит 17 таблицы и 23 рисунка. Структура работы включает введение, обзор научной литературы, раздел «Материалы и методы исследования», экспериментальную часть, выводы и список использованной литературы, насчитывающий 228 источника.