



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ

ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения**

К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

1

(21) 2301828

(22) 01.05..2023

(46) Бюл. 200, 2023

(71) (73) Мамадатохонова Гулдаста Никбахтшоевна, Муминов Абдукарим Абдусаломович (TJ).

(72) Мамадатохонова Г.Н. (TJ); Муминов А.А. (TJ); Тохирзода А.А. (TJ); Камолзода Ф.Б. (TJ); Курбонмамадова Г. (TJ).

(54) ШТАММ ВИРУСА БЕШЕНСТВА TAJ-FTA-NGS-2014 ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ АНТИГЕНА В РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ(56) Кузьмин И. В., Ботвинкин А. Д. Эпизоотологическая ситуация и перспективы борьбы с бешенством диких животных на юга западной Сибири // Микробиология. 2001. - №3. - С. 28-35.
Метлин А. Е., Чернышева Е. В., Рыбаков С.С. Бешенство животных эпизоотология, меры борьбы и перспективы. Ветеринария Кубани. 2009. - №6. - С. 2-4.
Bleck P.T., Rupprecht C.E. Rabies virus. In: Mandell, Douglas, and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edn // Churchill Livingstone. 2002. - P. 1811-1820.

Sokol F., Schlumberger H. D., Wiktor T. K. et al: Biochemical and biophysical studies on the nucleocapsid and on the RNA of rabies virus // Virology 1969. - Vol. 38. - P. 651-665.

WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004 — 121 p.

World Organisation for Animal Health (OIE)

Terrestrial manual. Rabies; 2013. — 28 p

Goldwasser R.A., Kissling R.E and Canki T.R.

Fluorescent antibody staining of rabies antigen in the salivary glands of rabid animals // Bull. WHO 20. 1959. - P. 579-588.

Dean D.J., Ableseth M.K., Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. editors // Laboratory techniques in rabies. Geneva. World Health Organization. 1996. - P. 88-95.

Метлин А. Е. Диагностика бешенства животных с использованием реакции иммунофлюоресценции // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2007.

2

- №3. - С. 29-33

Гулюкин А. М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. Вопросы вирусологии. 2014;59(3):5-10. [Gulyukin A.M. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2014;59(3):5-10 (In Russ.)]

Недосеков В.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства. Ветеринарная патология. 2002;1:41-7. [Nedosekov V.V. Comparative evaluation of methods for laboratory diagnosis of rabies. Veterinarnaya patologiya = Veterinary Pathology. 2002; 1:41-7 (In Russ.)]

Hiramastu K., Mannen K., Mifune K. Comparative sequence analysis of the M gene among rabies virus strain and its expression by recombinant vaccinia virus // Vir.Gen. 1993. - Vol.7. - P. 83-88.

Black E. M., Lowings P.J., Smith J., Heaton P.R., MacElhimney L.M. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies related viruses using TagMan technology // J. Virol. Method. 2002. - Vol.105. - P. - 25-35.

Недосеков В. В., Пантюшенко М. С., Цыбанов Я. С. Идентификация арктических и классических вирусов

в ПЦР // Ветеринарная газета. 2002. № 21. - С. 4.

(57) Изобретение относится к штаммам вируса бешенства животных для приготовления антигена содержащей сыворотки с целью серодиагностики бешенства животных в реакции диффузной преципитации и может быть использовано в ветеринарии.

Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 выделен от павшего от бешенства крупного рогатого скота на перевиваемой линии клеток почки сайги и инкубирован при 37°C и 5% CO2 заражающей дозе 0,005-0,01 ЦДП50 на клетку. В качестве питательной среды используется пристеночная полусинтетическая среда с добавлением 2% инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота. с pH

Биологическая активность вируса достигает $5,5 \lg 7,4-7,8$. Время культивирования 5- 7 суток. ЦПД/мл. Установлена патогенность штамма вирус бешенства экспериментально для лабораторных животных - белых мышей. Выделенный штамм вируса бешенства вызывал заболевания

белых мышей с летальным исходом как при интрацеребральном, так и при подкожном способах заражения. Смерть зараженных мышей наблюдалась через сутки и в редких случаях на 3-5 дней. Таким образом, предлагаемый штамм полностью безвреден для овец, собак, кроликов при подкожном, внутрикожном, внутримышечном введении.

Изобретение относится к штаммам вируса бешенства животных для приготовления антиген содержащей сыворотки с целью серодиагностики бешенства животных в реакции диффузной преципитации и может быть использовано в ветеринарии.

Бешенство (Rabies) - вирусная инфекционная болезнь природно-очагового типа, чувствительны многие виды домашних и диких животных, летучие мыши и человек, выражающееся поражением центральной нервной системы [1-2].

Бешенство вызывается нейротропными вирусами рода *Lyssavirus* из семейства *Rhabdoviridae*. Геном вируса бешенства представляет собой не сегментированную негативно-спиральную одноцепочечную РНК, состоящая из около 12000 нуклеотидов. РНК вируса бешенства кодирует 5 вирусных белков: N-нуклеопротеин, Р-фосфопротеин, М-матриксный протеин, G- гликопротеин L (Large) - ДНК полимеразы [3;4].

Диагностика бешенства должна быть быстрой и эффективной, чтобы оценить риск распространения инфекции и это также важно для надзора и контроля над эпидемией и эпизоотией.

В ветеринарной науке и практики используют широкий спектр лицензированных отечественных и импортируемых антирабических вакцин, создающих иммунитет продолжительностью не менее

одного года, различных форм в моно и поливалентных ассоциациях, способов их применения. Для специфической профилактики всех видов животных, применяют вакцины только убитого типа, за исключением диких плотоядных.

Для производства инактивированных антирабических вакцин применяют различные фиксированные штаммы вируса бешенства такие как CVS, НЕР, LEP, SAD, Щелково -51. В настоящее время для вакцинации домашних плотоядных и сельскохозяйственных в республике широко используются антирабическая инактивированная сухая культуральная вакцина из штамма «Щелково-51» , «Штамм -80» и CVS.

Наиболее близким аналогом (прототипом) является штамм вируса бешенства CVS [5;6], выделенное более 100 лет назад из полевых изолятов, ослабленные путём пассирования через мозг кроликов и адаптированные к мозгу мышей и клеточным линиям. Активность вирусной суспензии промышленного штамма CVS через 1 неделю после хранения при температуре -20°C составила $6,78 \pm 0,19 \lg \text{FFD}_{50}$ ($n = 5$) и не изменялась до 2-х месяцев хранения ($p \geq 0,05$). Между 2-м и 3-м месяцами хранения при данной температуре произошло достоверное снижение ($p \leq 0,05$), активности, как и на протяжении последующего хранения. Через 12 месяцев хранения при температуре -

20°C активность штамма CVS составила $4,96 \pm 0,29 \lg \text{FFD}_{50}$, что на $1,82 \lg \text{FFD}_{50}$ меньше, чем специфическая активность вируса при хранении в данном температурном режиме в течение недели. Однако все вышеописанные штаммы вируса бешенства культивируются в перевиваемых культурах клеток, имеют титр вируса не менее $6,00 \lg \text{MLD}_{50}/\text{мл}$, иммуногенность вакцин напрямую зависит от титра вируса.

Целью настоящего изобретения является создание отечественного штамма вируса бешенства, на основе которого создана антиген содержащая сыворотка для более точной диагностики вируса бешенства в реакции диффузионной преципитации (РДП).

Поставленная цель достигается получением нового штамма вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 для приготовления антиген содержащей сыворотки с целью серодиагностики бешенства в РДП.

Характеристика заявляемого штамма. Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 является типичным представителем вируса бешенства рода *Lyssavirus* из семейства *Rhabdoviridae* классический вирус бешенства (RABV). Заявляемый штамм выделен от павшего от бешенства крупного рогатого скота Файзабадского района Республики Таджикистан. Штамм депонирован в коллекции культур микроорганизмов Центре национальной коллекции патогенных микроорганизмов Института проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук под номером № 01.

Обнаружение антигенов вируса бешенства проводят методом флуоресцирующих антител, реакций

иммуноферментного анализа и реакции диффузионной преципитации.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) является золотым стандартом в диагностики бешенства согласно рекомендации ВОЗ [5]. Этот метод считается высокочувствительным, специфичным, недорогостоящим и выполняется менее чем за 2 часа [6]. Но существует и ряд недостатков такие как - отсутствие инструментального учета, субъективность оценки результатов, в связи с чем, необходимо профессиональное обучение и приобретение опыта работы [7].

Реакция диффузионной преципитации (РДП) – Реакция диффузионной преципитации (РДП) является широко используемым тестом для прямого обнаружения антигена вируса бешенства [8]. Этот методический прием основан на образовании линии преципитации в агаровом слое вследствие взаимодействия вирусного антигена со специфическим антителом. Выявления вируса бешенства при постановке РДП возможно при условии присутствия в образце вируса в концентрации не менее $4,5 \lg \text{LD}_{50}/\text{мл}$. [9].

Источник получения. Из головного мозга, погибшего от бешенства крупного скота, был выделен изолят вируса бешенства, который получил название TAJ-FTA-NGS-2014. Для выделения вируса было использовано перевиваемая линия клеток почки сайги путем пассажей на белых мышах сосунках. Специфическая активность полученных сывороток крови баран был оценен в реакции диффузионной преципитации с положительным

контрольным антигеном бешенства из коммерческого набора «Иммуноглобулин диагностический антирабический преципитирующий (ИДАП) для диагностики бешенства методом реакции диффузионной преципитации который составляет 1:16-1:32.

Инфекционная активность выделенного вируса составляла $5,5 \lg \text{LD}_{50}/\text{мл}$.

Полимеразная цепная реакция. Детекция фрагментов генома проводят в обратном транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с последующим изучением нуклеотидной последовательности [10]. Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять ветеринарную диагностику на качественно новый уровень [11;12].

Идентификация вируса. Для идентификации изолятов вируса бешенства нами использованы ОТ-ПЦР и антигенный анализ с помощью моноклональных антител. РНК вируса бешенства выделяли с помощью FTA (фильтровальный диск) и набором RNeasy Mini Kit QIAGEN, USA. Постановка реакции выполнена согласно протоколу к диагностическому набору. Проведено 45 циклов амплификации в следующем режиме: 42°C – 30 мин, 94°C - 2мин, 94°C - 30сек, 55°C - 30сек, 720C – 30 сек. Место, вид, количество исследованных жи-

вотных и результаты ОТ-ПЦР приведены в таблице 1. Как видно, в 1 из 12 исследованных проб выявлены РНК вируса бешенства.

На Фиг. 1 показаны результаты полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием TaqMan на бешенство и на Фиг. 2. электрофореграмма амплификации ПЦР вируса бешенства. Размер ПЦР продукта вируса бешенства 120 п.о. на 2% агарозном геле.

Была изучена степень антигенного родства полевого изолята вируса бешенства Файзабадского района с помощью моноклональных антител, показана степень антигенного родства полевого изолята вируса бешенства Файзабадского района. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности генов показал принадлежность штамма TAJ-FTA-NGS-2014. рода *Lyssavirus* из семейства *Rhabdoviridae* к классическому вирусу бешенства (RABV) генотипу 1. По антигенному варианту полевой изолят вируса бешенства Файзабадского района совпадает на 100% с Афганистанским, на 93% с Азербайджанским и на 90% с Турецким вирусом бешенства. На Фиг.3 показана дендрограмма Файзабадского изолята вируса бешенства по антигенному родству.

Культуральные свойства. Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 выделен на перевиваемой линии клеток почки сайги и инкубирован при 37°C и 5% CO₂ заражающей дозе 0,005-0,01

ЦДП50 на клетку. В качестве питательной среды используется пристеночная полусинтетическая среда с добавлением 2% инаktivированной сыворотки крови крупного рогатого скота с рН 7,4-7,8. Время культивирования 5- 7 суток. Биологическая активность вируса достигает 5,5 lg ЦПД/мл. Установлена патогенность штамма вируса бешенства экспериментально для лабораторных животных - белых мышей. Выделенный штамм вируса бешенства вызывал заболевания белых мышей с летальным исходом как при интрацеребральном,

так и при подкожном способах заражения. Смерть зараженных мышей наблюдалась через сутки и в редких случаях на 3-5 дней. Предлагаемый штамм полностью безвреден для овец, собак, кроликов при подкожном, внутрикожном, внутримышечном введении.

Было исследовано 26 проб головного мозга подопытных на вирус бешенство от сельскохозяйственных животных (КРС и ослы) и собак. Образцы подвергались анализам по РИФ, РДП и ПЦР.

№	Район/город	Вид животного	РДП	РИФ	Биопроба
1	Балхи	Собака	+	+	+
2	Балхи	Собака	+	+	+
3	Ляхш	Собака	-	+	+
4	Леваканд	Собака	-	-	-
5	Леваканд	КРС	-	+	+
6	Леваканд	Собака	+	+	+
7	Рудаки	Собака	-	-	+
8	Рудаки	Собака	-	-	-
9	Кушониен	Собака	+	+	+
10	Кушониен	КРС	-	-	-
11	Кушониен	Собака	-	-	-
12	Джайхун	Собака	-	-	-
13	Джайхун	Собака	+	+	+
14	Темурмалик	КРС	+	+	+

15	Темурмалик	Собака	+	+	+
16	Бохтар	Собака	+	+	+
17	Яван	Собака	+	+	+
18	Яван	Собака	-	-	-
19	Шахритус	КРС	+	+	+
20	Шахритус	Собака	+	+	+
21	г. Душанбе	Собака	+	+	+
22	г. Душанбе	Собака	-	+	+
23	г. Душанбе	Ослы	+	+	+
24	г. Душанбе	Собака	+	-	+
25	Нурек	Собака	+	-	+
26	Файзабад	Собака	+	+	+

По результатам сравнительной диагностики бешенства в РДП, РИФ и ПЦР из 26 исследованных проб, положительными в РДП были -16, в РИФ -17 и в ПЦР – 20 проб. Как видно наиболее чувствительными и специфичными из проведенных методов диагностики являются РИФ и ПЦР. Полимеразная цепная реакция - надежный и быстрый метод для выделения вирионной РНК из любых проб, содержащих вирус в низкой концентрации, а также позволяет проводить штаммовую дифференцировку вируса

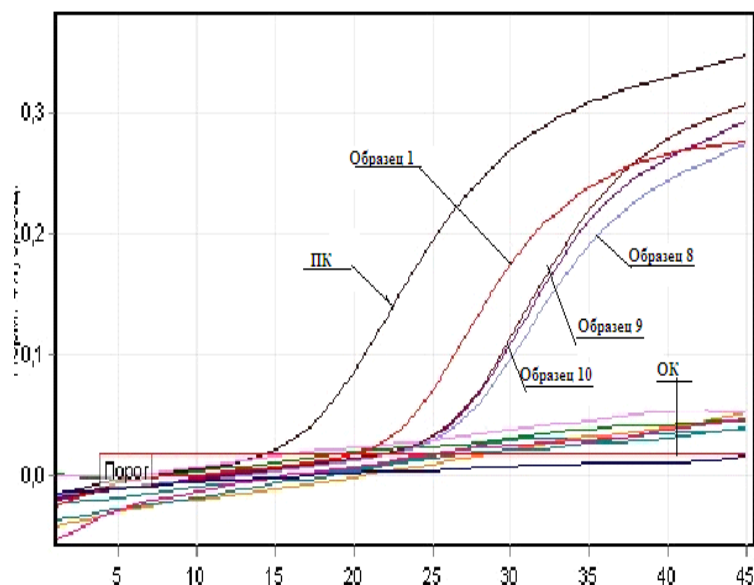
бешенства. Однако, несмотря на то, что ПЦР диагностика высокоспецифичная и высокочувствительна, и для её выполнения требуются соблюдение строжайших правил оснащения лаборатории, дорогостоящие диагностические реагенты и специально обученный персонал. Тем не менее, РДП по сравнению с ПЦР является экономичным, скоростным и простым в выполнении, а также единственным классическим методом при исследовании загнившего материала.

11

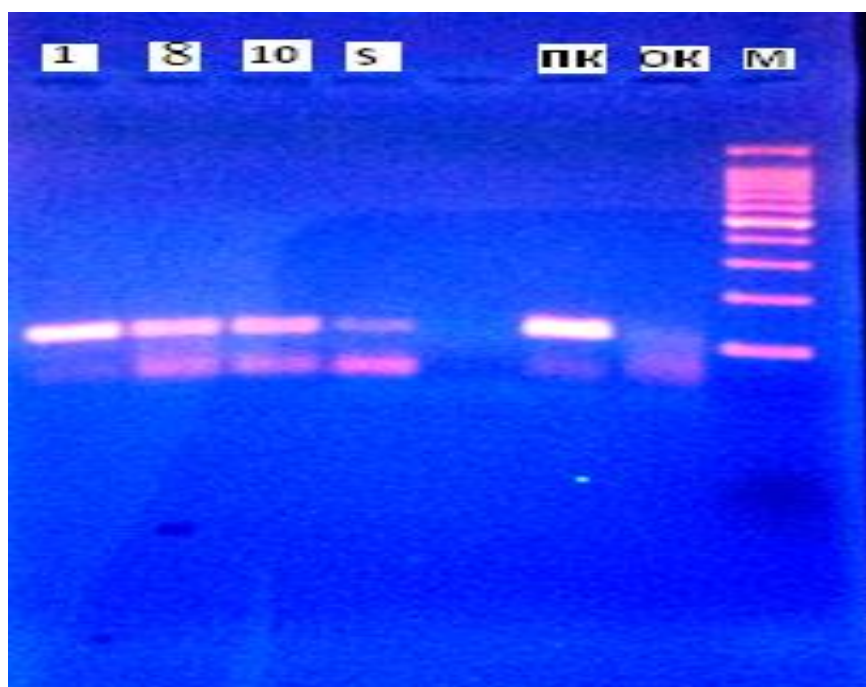
1431

12

Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 для изготовления антигена в реакции преципитации



Фиг. 1.



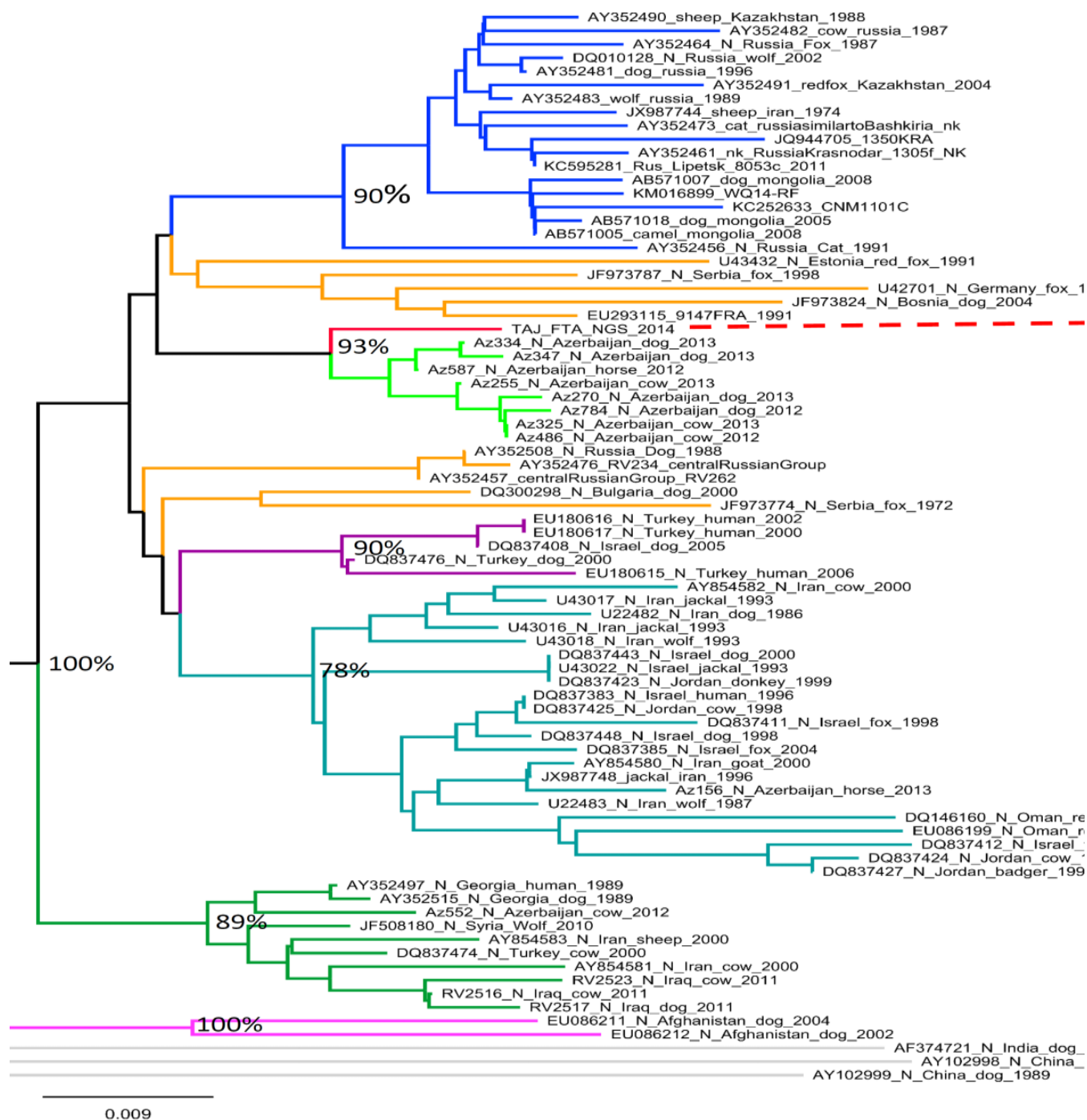
Фиг. 2

13

1431

14

Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 для изготовления антигена в реакции преципитации



Фиг. 3.

15

1431

16

Формула изобретения

Штамм вируса бешенства TAJ-FTA-NGS-2014 для изготовления антигена в реакции преципитации депонирован в коллекции культур микроорганизмов Центра национальной коллекции патогенных

микроорганизмов Института проблем биологической безопасности и биотехнологии Таджикской академии сельскохозяйственных наук под номером № 01.

Компьютерный набор: Алиева Л..

Заказ
Национальный патентно-информационный центр РТ 734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14а

Тираж

Подписное