

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ПРИМАТОЛОГИИ

На правах рукописи

ШАМСУТДИНОВА
ОЛЬГА АНАТОЛЬЕВНА

ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИННЫХ
ШТАММОВ ВИРУСА КРАСНУХИ

03.02.02 — Вирусология

научный доклад

Научный руководитель:

к.б.н., Карал-оглы Джина Джинаровна

Научный консультант:

д.м.н., Лаврентьева Ирина Николаевна

СОЧИ – 2021

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

В настоящее время иммунизация против такой детской инфекции как краснуха в Российской Федерации и во всем мире проводится с использованием живых вакцин, действующим началом которых являются аттенуированные штаммы вируса краснухи. В Китае и Японии специфическая профилактика краснухи проводится национальными вакцинами, полученными на основе эндемичных для этих стран штаммов вируса краснухи DCRB 19 и MEQ-11, соответственно. В Российской Федерации профилактика краснухи, и прежде всего, синдрома врожденной краснухи (СВК) проводится с 1997 года. Ввиду того что в России до сих пор нет своей национальной вакцины на основе эндемического для нашей страны штамма вируса краснухи, все эти годы население иммунизируют живой краснушной вакциной на основе штамма RA27/3. Несмотря на высокое антигенное родство штаммов вируса краснухи различных генотипов, использование краснушной вакцины на основе не эндемичных для данной территории штаммов, может привести к филогенетическим изменениям под давлением коллективного иммунитета и создать потенциальную угрозу возникновения его дрейфовых вариантов со значимыми мутационными изменениями генома. В 1979 году в НИИЭМ им. Пастера В.Н. Мешаловой был выделен и аттенуирован серийным пассированием в первично-трипсинизированной культуре клеток почки кролика (ППК) эндемичный для территории нашей страны штамм «Орлов». Однако, несмотря на успешно проведенные клинические испытания, показавшие высокую иммуногенность и низкую реактогенность данного штамма, вакцинный штамм «Орлов» не был внедрен в производство.

Исследования в этом направлении были возобновлены в начале 2000-ых годов. Лаврентьевой И.Н. с соавторами были получены вакцинные штаммы «Орлов-В» и «Орлов-Д» адаптированные к более технологичному тканевому субстрату (диплоидной линии клеток человека М-22). Проведенные исследования по определению иммуногенной и протективной активности штаммов на обезьянах макака-резус, показали высокую иммуногенную активность, не уступающую иммуногенности штамма RA 27/3, входящего в состав зарубежных живых краснушных вакцин.

Разработка новых медицинских иммунобиологических препаратов, в том числе и живых вакцин, включает как контроль специфической активности, так и определение степени остаточной нейровирулентности аттенуированных штаммов вирусов. Необходимо отметить, что в настоящее время единственным методом оценки

специфической безопасности вакцинных штаммов в тесте интрацеребрального заражения обезьян является патоморфологическое исследование ЦНС инокулированных животных.

В связи с тем, что вирус краснухи обладает выраженными тератогенными свойствами, способными вызывать генерализованную и персистирующую внутриутробную инфекцию плода, необходимым этапом доклинического изучения вакцинного штамма для живой аттенуированной вакцины против краснухи является контроль утраты тератогенности, присущей «диким» штаммам вируса.

Учитывая особую важность заключения о безопасности применения вакцин, содержащих хоть и ослабленные, но живые нейровирулентные вирусы, весьма актуальным представляется разработка дополнительных подтверждающих стабильность аттенуации тестов, основанных на современных методах лабораторной диагностики.

В настоящее время в лабораторной диагностике все чаще используют молекулярно-биологический метод исследования – полимеразную цепную реакцию с детекцией в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ), для которой характерна высокая специфичность и чувствительность. Преимуществом данного метода является не только возможность совмещения детекции и количественного определения специфической последовательности ДНК/РНК в образце в реальном времени после каждого цикла амплификации, но и отсутствие стадии электрофореза, что позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов.

Цель исследования – изучение специфической безопасности вакцинного штамма вируса «Орлов В» в сравнительном аспекте с зарегистрированным штаммом RA27/3 в эксперименте на обезьянах макаках резус.

Задачи исследования:

1. Провести комплексное изучение тератогенных свойств вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в сравнении с вакцинным штаммом RA27/3 в опыте на обезьянах макаках резус.
2. Оценить возможность использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при изучении тератогенных свойств аттенуированного вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В».
3. Изучить остаточную нейровирулентность вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в опыте на обезьянах макака-резус в сравнительном аспекте с вакцинным штаммом RA27/3 вируса краснухи.

4. Изучить морфологические изменения в ЦНС и периферических органах обезьян при интрацеребральном введении низкоаттенуированного штамма вируса краснухи «Орлов-14» в динамике клинического наблюдения за животными.
5. Провести сравнительный анализ патоморфологических изменений в ЦНС обезьян при интрацеребральной инокуляции вакцинными и низкоаттенуированными штаммами вируса краснухи.
6. Изучить возможность выявления РНК вируса краснухи из ЦНС и периферических органов обезьян методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при интрацеребральной инокуляции штаммов вируса краснухи.

Научная новизна работы

В результате проведенных исследований получены новые данные по характеристике биологических свойств высокоаттенуированных штаммов вируса краснухи, подтверждающие пригодность данных штаммов для живых краснушных вакцин.

Показано, что метод ПЦР-РВ может быть использован для подтверждения специфической безопасности вакцинных штаммов вируса краснухи.

Впервые проведено комплексное изучение тератогенных свойств вакцинного штамма «Орлов-В» вируса краснухи, установившее отсутствие маркеров врожденной краснушной инфекции у детенышей, родившихся от обезьян, привитых во время беременности.

Установлен низкий уровень остаточной нейровирулентности штамма «Орлов-В» вируса краснухи, в тесте интрацеребрального заражения обезьян, что подтверждает ареактогенность вакцинного штамма.

Получены новые сведения о локализации и степени выраженности морфологических изменений в ЦНС обезьян, интрацеребрально инокулированных вакцинными и низкоаттенуированными штаммами вируса краснухи.

Установлено, что при низком уровне аттенуации штаммов вируса краснухи (в нашем эксперименте на примере низкоаттенуированного штамма «Орлов-14») при интрацеребральном введении обезьянам, вирус может не только размножаться в клетках ЦНС, распространяться по отделам ЦНС, но и преодолевать гематоэнцефалический барьер, поражая периферические органы обезьян.

Теоретическая и практическая значимость

Показана возможность использования альтернативной, по отношению к классическим патоморфологическим методам, стратегии доклинической оценки

специфической безопасности противовирусных вакцин с применением комплекса клинических, иммунологических, патоморфологических и вирусологических методов.

Показана высокая степень аттенуации вакцинных штаммов «Орлов-В» и RA27/3 вируса краснухи – отсутствие тератогенных свойств и остаточной нейровирулентности, что свидетельствует об успешном завершении доклинического изучения специфической безопасности аттенуированных штаммов и создает реальные предпосылки для проведения клинических испытаний вакцинного штамма «Орлов-В».

Получены патоморфологические данные, которые могут служить морфометрическими параметрами, отражающими низкий уровень аттенуации штаммов вируса краснухи. Установлено, что при низком уровне аттенуации штаммов вируса краснухи при интрацеребральном введении обезьянам, вирус может не только размножаться в клетках ЦНС, распространяться по отделам ЦНС, но и пересекать гематоэнцефалический барьер, поражая периферические органы обезьян.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Вакцинные штаммы «Орлов-В» и RA27/3 вируса краснухи не обладают тератогенными свойствами в опыте на обезьянах макака-резус.
2. Доклиническое изучение вакцинных штаммов «Орлов-В» и RA27/3 на обезьянах макаках резус установило отсутствие остаточной нейровирулентности данных штаммов.
3. Показана информативность ПЦР-РВ как теста, подтверждающего специфическую безопасность вакцинных штаммов для живых вирусных вакцин на этапе их доклинического изучения.

Апробация работы

Результаты работы были представлены:

- на Научно-практической конференции молодых ученых «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации», г. Санкт-Петербург, 23-25 апреля 2014;
- на Юбилейной научно-практической конференции «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, г. Санкт-Петербург, 25-27 июня 2014;
- на III Сочинской международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии», г. Сочи, 8-10 августа 2016;

- на Сухумской международной научно–практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной биологии и медицины», г. Сухум, Абхазия, 20-22 сентября 2017;
- на Международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии», г. Сочи, 18-19 апреля 2019;
- на VII Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, г. Новосибирск, 5-8 октября 2020;
- на Международной научной конференции «Инновационные исследования в биологии и медицине», г. Сочи, 25-27 ноября 2020.

По результатам исследования опубликовано 12 печатных работ, из них – 3 статьи в реферируемых журналах ВАК Минобрнауки РФ, входящих в базы цитирования WoS и Scopus.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось на базе лаборатории иммунологии и биологии клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», а также лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Все процедуры с животными в исследовании рассмотрены и утверждены Комиссией по биоэтике ФГБНУ «НИИ МП». Обращение с животными проводилось в строгом соответствии с Правилами содержания и ухода за нечеловекообразными приматами (ГОСТ 33218-2014) и требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и Директивы №2010/63/EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010 г.

Материалы и методы исследования

В работе использовали живые аттенуированные вакцинные штаммы вируса краснухи: «Орлов-В», полученный из коллекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» и RA27/3, входящий в состав коммерческой живой аттенуированной вакцины производства ФГУП «НПО «Микроген». В исследовании также использовали низкоаттенуированный штамм вируса краснухи «Орлов», изолированный в 1979 г. В.Н. Мешаловой от ребенка, больного манифестной формой краснухи и прошедшего 14 пассажей на культуре клеток ППК (ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»).

Исследования проводили на 35 клинически здоровых серонегативных обезьянах (13 беременных самок и 27 самцов) вида *Macaca mulatta* в возрасте от 3 до 6 лет и весом 3-5 кг, содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». Животных содержали в индивидуальных клетках, оборудованных автоматическими поилками, при температуре 22-26°C и относительной влажности воздуха 60-70%. Пищевой рацион состоял из полнорационного комбикорма, фруктов, овощей, рисовой каши с изюмом, печенья по средним нормативам потребления корма. Животные имели свободный доступ к воде из центрального водопровода. Животные адаптировались к условиям содержания и персоналу в течение 14 дней.

Для изучения тератогенных свойств вакцинных штаммов вируса краснухи иммунизацию животных осуществляли однократным внутримышечным введением серонегативным к краснухе обезьянам 0,5 мл препаратов из исследуемых штаммов. Прививочная доза соответствовала 1 прививочной дозе для человека – не менее 1000 ТЦД50. Определение титров антител в сыворотке крови иммунизированных беременных обезьян проводили в РТГА, через 28 – 30 суток после иммунизации, используя «Диагностикум краснушный антигенный сухой для РТГА» производства ОНТ ФГУН «Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера» в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Антитела IgM-фракции определяли в сыворотке крови детенышей первого месяца жизни, родившихся от иммунизированных во время беременности самок. Для определения IgM-антител методом ИФА использовали тест-систему Вектор-Рубелла-IgM-стрип в соответствии с инструкцией по применению.

Клиническое наблюдение за новорожденными обезьянами проводили в течение 90 суток ежедневно, на протяжении которых отмечали наличие или отсутствие отставания в развитии, клинических симптомов поражения центральной нервной системы, дыхательной системы, органов слуха и зрения.

Новорожденные животные, погибшие в родах, были исследованы патоморфологически: производили аутопсию, морфологическое и гистологическое исследование внутренних органов. Гистологическому исследованию (с окраской гематоксилином и эозином и по методу Ниссля) были подвергнуты головной мозг, легкие, печень, почка, поджелудочная железа, селезенка новорожденных, а также плацента самок.

В работе использовали метод полимеразной цепной реакции с электрофоретическим анализом продуктов ПЦР-амплификации «АмплиСенс Rubella virus-EPH» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва).

Анализ продуктов амплификации проводили разделением фрагментов кДНК в 2% агарозном геле. Все этапы реакции проводили по стандартной схеме в соответствии с инструкцией по применению.

Для изучения остаточной нейровирулентности вакцинных штаммов вируса краснухи проводили интрацеребральное заражение обезьян:

Вирусодержащий материал вводили обезьянам под глубоким наркозом, который достигался введением 0,1 мл ксилы («Интерхеми веркен «Де Аделаар» Эести АС», Эстония) и 0,05 мл золетила («Valdepharm», Франция) из расчета на 1,0 кг массы животного. Материал вводили в объеме 0,25 мл в зрительный бугор каждого полушария головного мозга. Перед введением исследуемого материала шерсть на голове у обезьян тщательно сбривали, и операционное поле дважды обрабатывали 70% спиртом и 10% настойкой йода. С целью последующего образования «биологического шва» в момент заражения кожу головы натягивали назад и фиксировали рукой. Для заражения использовали иглу длиной 5 см и диаметром 0,6 мм. Вирусодержащий материал вводили в трепанационное отверстие, сделанное сверлом диаметром 1,5 мм отступая 0,5 см назад от коронарного шва и на 1 см латеральнее сагиттального шва на глубину 2,5 см. Используемая методика интрацеребрального заражения позволяла уменьшить вероятность повреждения стенок желудочков мозга и предупредить развитие посттравматических реакций.

Клиническое наблюдение за обезьянами проводили ежедневно в течение 28 суток, на протяжении которых регистрировали наличие или отсутствие общих клинических симптомов (нарушение аппетита, повышение температуры тела, вялость, беспокойство) и признаков поражения ЦНС (тремор конечностей, нарушение координации, парезы, параличи).

Эвтаназия

Перед эвтаназией обезьян вводили в глубокий наркоз, вводя в паховую вену животного 1 мл золетила («Valdepharm», Франция) и 4 мл ксилы («Интерхеми веркен «Де Аделаар» Эести АС», Эстония). После того, как животное входило в глубокий сон, в эту же вену вводили 5 мл листенона («Такеда Австрия ГмбХ», Австрия), что приводило к полной остановке сердца.

Серологический метод

Выявление антител (АТ) к вирусу краснухи осуществляли в сыворотке крови обезьян методом ИФА с помощью коммерческих тест-систем «ВекторРубелла-IgG» производства АО «ВЕКТОР-БЕСТ» (г. Новосибирск) и «ИФА-Краснуха-IgG» (НПО «Эколаб-диагностика», г. Электрогорск). Постановку реакций проводили согласно

инструкциям по применению, прилагаемых производителями. Измерение оптической плотности (ОП) проводили на фотометре INFINITE F50 (США) при длине волны 450 нм.

Молекулярно-генетические методы

В работе использовали метод ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Выделение РНК из 10% суспензии образцов тканей ЦНС, паренхиматозных органов, а также спинномозговой жидкости и плазмы периферической крови проводили с помощью коммерческих наборов: «РИБО-сорб», «РИБО-золь-С», «РИБО-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и «AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit» («Qiagen», Германия) (табл.1). Все этапы экстракции РНК выполнялись согласно инструкции производителя для соответствующего комплекта реагентов.

Таблица 1.

Наборы, используемые для проведения экстракции РНК из исследуемого материала.

Клинический материал	Название набора
Головной мозг, спинной мозг (шейный и поясничный отделы)	«AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit»
Периферические органы: легкое, печень, селезенка, заднешейные и подчелюстные лимфатические узлы, а так же спинномозговая жидкость.	«РИБО-золь-С» + «РИБО-преп»
Плазма периферической крови, ВСЖ	«РИБО-сорб»

Для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реально времени» использовали набор реагентов «АмплиСенс Rubella virus-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Все этапы выполняли по стандартному протоколу производителя, но при проведении ПЦР-амплификации температурный режим и время проведения денатурации, отжига и элонгации было изменено. Условия проведения реакции: 50 °С – 25 мин., 95 °С – 8 мин., затем 50 циклов: 94 °С – 15 сек., 58 °С – 25 сек. и 72 °С – 20 сек.

Постановку ПЦР и последующий анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения прибора «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Pty Ltd., Австралия).

Культуральный метод

Титрование штаммов вируса краснухи по ЦПД проводили в культуре клеток ВНК-21. С этой целью из различных отделов ЦНС и паренхиматозных органов готовили 10% суспензию, растерев образцы ткани в стерильной фарфоровой ступке, после чего к

суспензии добавляли физиологический раствор в соотношении 1:9 и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для приготовления последовательных 10-кратных разведений от 10^{-1} до 10^{-8} , как описано выше. Каждое из разведений вносили по 100 мкл в 4 лунки 96-луночного планшета. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубировали в термостате с 5% CO_2 при температуре 35 °С. Учет результатов проводили на 12 сутки по реакции ЦПД. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Гистологическое исследование

Для проведения гистологического исследования головной и спинной мозг, а также лимфатические узлы и висцеральные органы фиксировали в растворе нейтрального забуференного 10% формалина, обезвоживали в спиртах по общепринятой методике, заливали в парафиновые блоки и нарезали на срезы толщиной 4 – 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и крезилловым фиолетовым по методу Ниссля.

Патоморфологические изменения в ЦНС оценивали по 4-балльной шкале [ФК статья]: 0 – без изменений; 1 – слабая инфильтративно-продуктивная тканевая реакция: обратимые дистрофические изменения единичных нейронов, слабая диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов вокруг сосудов и проводников, единичные васкулиты; 2 – умеренная инфильтративно-продуктивная тканевая реакция: дистрофические изменения менее 50% нейронов, умеренная диффузно-очаговая пролиферация глиальных и гистиоцитарных элементов, васкулиты; 3 – выраженная инфильтративно-продуктивная тканевая реакция: дистрофические изменения и деструкция более 50% нейронов, множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации; 4 – тотальная инфильтративно-продуктивная тканевая реакция: дистрофические изменения и деструкция более 90% нейронов, множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации в паренхиме мозга за пределами перитравматической зоны. Средний балл поражений ЦНС подсчитывали для каждого отдела и для каждой обезьяны.

Основные результаты исследования и их обсуждение

Изучение тератогенных свойств вакцинного штамма «Орлов-В»

Беременность 11 из 13 самок разрешилась нормальными, срочными родами; в двух случаях (1 – самка, иммунизированная препаратом из штамма «Орлов-В», 1 – препаратом из штамма RA 27/3) беременность завершилась мертворождением вследствие родовой травмы.

На протяжении 90 суток после рождения детеныши ежедневно осматривались врачом-ветеринаром для оценки наличия или отсутствия отставания в развитии, клинических симптомов поражения центральной нервной системы, дыхательной системы, органов слуха и зрения. Ни у одного из детенышей, родившихся живыми и получавших грудное вскармливание, внешних пороков и аномалий развития выявлено не было. Детеныши активно развивались, их поведение, вес, слух, зрение и структура костного аппарата соответствовала возрастной норме. При рентгенологическом исследовании скелета детенышей у 2-х детенышей (один – из группы «Орлов-В», другой – из группы «плацебо») были выявлены рахитоподобные изменения костей, однако эти изменения не являются вирусспецифическими и связаны с особенностями питания обезьян.

Для определения возможной связи смерти двух детенышей с вакцинацией их матерей во время беременности, было проведено патоморфологическое и вирусологическое исследование органов и тканей детенышей, а также плаценты. Ни в одном случае вирусспецифических поражений органов и тканей у погибших новорожденных выявлено не было. Гистологическая картина головного мозга и периферических органов соответствовала норме. Таким образом, в обоих случаях смерть детенышей наступила по причинам, не связанным с иммунизацией матерей против краснухи во время беременности.

При проведении вирусологического исследования в качестве сравнительного материала использовали аутопсийный материал детеныша, не включенного в настоящий эксперимент, и погибшего от алиментарной дистрофии из-за отсутствия грудного вскармливания (отсутствие молока у матери)(инвентарный № 32771).

В результате проведенного исследования ни в одном из исследованных образцов РНК вируса краснухи не обнаружена (рис.1), что свидетельствует об отсутствии проникновения вакцинных штаммов вируса краснухи через плаценту и, отсутствии внутриутробного инфицирования плода в каждом из исследованных случаев гибели новорожденного.

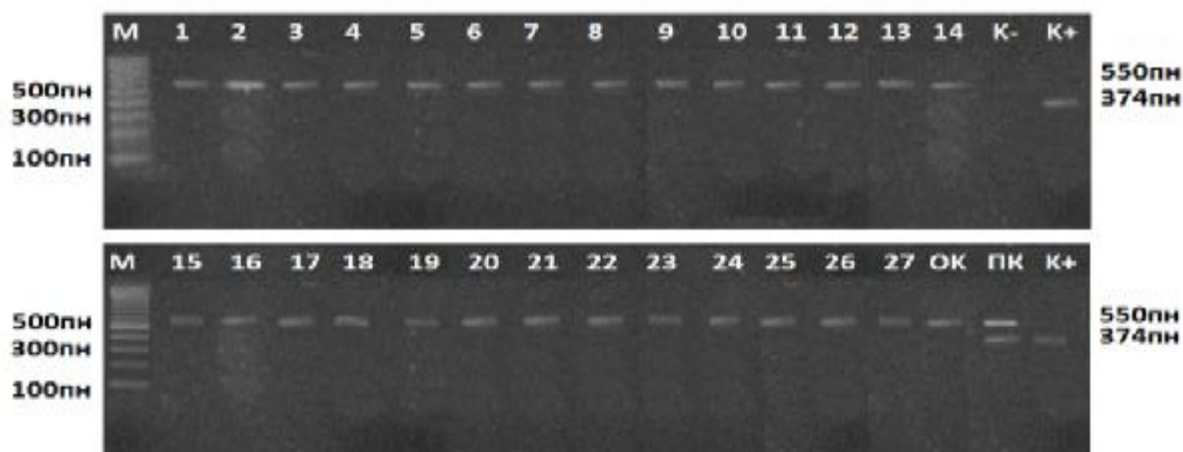


Рис. 1 Детекция РНК вируса краснухи (Rubellavirus) в клиническом материале методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в 2% агарозном геле.

Примечание: М- маркер длин фрагментов пар нуклеотидов; 1- 27 образцы клинического материала; К- отрицательный контроль ПЦР амплификации кДНК; К+ положительный контроль ПЦР амплификации кДНК; ОК- отрицательный контроль экстракции РНК; ПК- положительный контроль экстракции РНК.

Исследование сывороток крови самок, однократно иммунизированных против краснухи во время беременности, показало 100% сероконверсию, то есть, все подопытные животные ответили на введение вакцинных препаратов образованием специфических антител в высоких титрах. В то же время, по окончании периода наблюдения в сыворотке крови животного группы «плацебо» специфические антитела не определялись (табл. 2).

Таблица 2.

Титры антител в РТГА в сыворотке крови иммунизированных и не иммунизированной против краснухи обезьян

№ обезьяны	Штамм,использованный для иммунизации	Титры антител в РТГА
34086	«Орлов-В»	1:320
33605	«Орлов-В»	1:160
37085	«Орлов-В»	1:640

37174	«Орлов-В»	1:1280
37686	«Орлов-В»	1:320
32771	«Орлов-В»	1:160
37721	«Орлов-В»	1:640
33276	«Орлов-В»	1:1280
37988	«Орлов-В»	1:640
31939	RA27/3	1:640
37301	RA27/3	1:320
33992	RA27/3	1:640
36518	Плацебо	< 1:10

Е. Miller и соавт. показали, что частота выявления IgM- антител в сыворотках крови детей с внутриутробной инфекцией краснушной этиологии максимальна в первый месяц жизни, когда она составляет 100%. На основании этих данных, исследование сывороток крови детенышей на наличие IgM-фракции противокраснушных антител проводили, собирая образцы крови в течение первых 30 суток после рождения. В качестве положительного и отрицательного контроля (помимо контролей, заложенных в тест-системе) были исследованы две сыворотки крови людей: одна, полученная от больного с лабораторно подтвержденной краснухой, другая – от больного с отрицательным результатом на IgM-антитела к вирусу краснухи. Ни в одном случае в сыворотке крови детенышей, родившихся от иммунизированных во время беременности матерей, не было выявлено противокраснушных IgM.

Изучение остаточной нейровирулентности вакцинных штаммов вируса краснухи

Исследование проводили на 14 клинически здоровых серонегативных самцах вида *Macaca mulatta* в возрасте от 3 до 6 лет и весом 3-5 кг, содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». Обезьяны были распределены на 3 группы: 10 животным первой группы было проведено интрацеребральное введение препарата, содержащего производственный штамм «Орлов-В», 2 животным из второй группы – препарата сравнения (коммерческой

краснушной вакцины Rudivax, содержащей штамм RA27/3), и 2 контрольным обезьянам (третья группа) – растворитель вакцины.

Наблюдение за обезьянами проводили ежедневно в течение 30 суток, на протяжении которых регистрировали наличие или отсутствие общих клинических симптомов и признаков поражения центральной нервной системы. По истечению периода клинического наблюдения проводили аутопсию животных, морфологическое и гистологическое исследование головного, спинного мозга и других периферических органов.

Гистологическому исследованию подлежали передняя и задняя центральные извилины правого и левого полушария, таламус (зрительные бугры), средний мозг, варолиев мост, мозжечок, продолговатый мозг, шейное и поясничное утолщения спинного мозга, а также подчелюстные, затылочные и задне-шейные лимфатические узлы, легкое, селезенка и печень. Степень патоморфологических изменений в ЦНС животных определяли по четырех балльной шкале, рекомендованной Министерством здравоохранения Российской Федерации для «Оценки специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» ОФС.1.7.2.0010.15.

Согласно результатам гистологического исследования ЦНС обезьян, инокулированных вакцинными штаммами «Орлов-В» и RA27/3 средний балл поражений ЦНС у данных обезьян составил 0,0. Все органы и ткани имели типичную анатомическую и гистологическую структуру.

Выявление РНК вируса краснухи осуществляли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Материалом для проведения ПЦР-РВ служили пробы РНК, выделенные из внутренних органов (лимфатические узлы, кусочки легкого, поджелудочной железы, печени и селезенки) экспериментальных животных.

В результате анализа кривых накопления флуоресцентного сигнала было установлено, что для всех исследуемых образцов получены значения менее установленного порогового значения отрицательного результата, поэтому все результаты амплификации считались отрицательными (табл. 3). Полученные данные подтверждают результаты гистологического исследования внутренних органов экспериментальных животных, в результате проведения которого не было обнаружено патологических изменений. Гистологическая картина периферических органов соответствовала норме. У всех экспериментальных животных строение легких, печени, почек и селезенки определялось как типичное, без особенностей, гиперемия и посторонняя клеточная

инфильтрация отсутствовали. Ткань легких определялась как воздушная. Межальвеолярные перегородки тонкие, просветы альвеол и бронхов свободные.

Таблица 3

Выявление РНК вируса краснухи в тканях внутренних органов обезьян, зараженных интрацеребрально вакцинными штаммами вируса краснухи

Группа	№ обезьяны	Материал для заражения	Аутопсийный материал	Результат
I	38301	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38295	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38580	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38813	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	39029	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38304	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	37618	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	37726	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	37344	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	37876	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
II	38429	Штамм RA 27/3	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38348	Штамм RA 27/3	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
III	38781	Растворитель вакцины	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
	38980	Растворитель вакцины	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень,	Не обнаружено

			селезенка	
--	--	--	-----------	--

Экспериментальное изучение краснушного вакцинального процесса

Исследование проводили на 10 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3-5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП». В опыт отбирали животных, не содержащих в сыворотке крови нейтрализующих антител к вирусу краснухи. Обезьяны были рандомизированы на 3 группы методом случайных чисел. Животным первой группы (n = 4) интрацеребрально вводили препарат, содержащий «дикий» штамм «Орлов». Обезьянам второй группы (n = 4) вводили аттенуированный штамм «Орлов-В». Животному третьей группы (n = 2) – вакцинный штамм RA27/3, входящий в состав культуральной живой вакцины против краснухи, производства ФГУП «НПО «Микроген», Россия.

Для подтверждения факта инфицирования по окончании периода наблюдения у животных брали кровь из паховой вены, после чего животных выводили из эксперимента под глубоким наркозом. Согласно Плану исследования одному животному из I и II группы была проведена эвтаназия на 2 сутки эксперимента; по одному животному из I, II и III группы на 12 сутки; по одному животному из I и II группы на 21 сутки и ; по одному животному из I, II и III группы на 28 сутки эксперимента. Во время проведения аутопсии осуществляли забор тканей ЦНС, лимфатических узлов, висцеральных органов и СМЖ для проведения гистологического, вирусологического и молекулярно-генетического исследований.

В период клинического наблюдения за животными I группы на 2-е сутки после заражения ни у одного из животных не наблюдалось проявлений общих клинических и неврологических симптомов (табл. 4). У обезьяны № 42884, инокулированной «диким» штаммом вируса краснухи «Орлов-14» в титре 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5мл на 10 день эксперимента наблюдалось повышение температуры тела до 39,5 °С (табл. 5), отсутствие аппетита и вялость. На 11 и 12 дни эксперимента, зафиксированные отклонения от физиологической нормы сохранялись, у данной особи было отмечено: повышение температуры тела, отсутствие аппетита, вялость, слабость конечностей, тремор левой верхней конечности, отсутствие прыжков и лазанья по клетке. У животных № 43389 и № 43419, также зараженных «диким» штаммом вируса краснухи «Орлов-14», но в меньшей дозе – 3,8 lg ТЦД₅₀/0,5мл, наблюдалось незначительное повышение температуры тела и снижение аппетита, каких-либо других нарушений со стороны ЦНС отмечено не было. У обезьяны № 43389 повышенная температура тела регистрировалась на протяжении 3 дней, с 15 по 17 день эксперимента, у обезьяны № 43419 – 2 дней, с 14 по 15 день эксперимента, по

истечению данного периода общее клиническое состояние животных не отличалось от физиологической нормы.

На протяжении периода клинического наблюдения за обезьянами II и III группы, инфицированных штаммами «Орлов-В» и RA 27/3, соответственно, ни у одного из животных не было отмечено проявление общих клинических и неврологических симптомов, типичных для данного заболевания: повышенная температура, нарушение аппетита, вялость, беспокойство, тремор конечностей, нарушение координации, парезы и параличи. Клиническое состояние экспериментальных животных II и III группы соответствовало физиологической норме.

Таблица 4.

Результаты клинического наблюдения за экспериментальными животными

Группа	№ обезьяны	День эксперимента																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
I	42716	N	N Э																										
	42884	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P Э																
	43389	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N Э							
	43419	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
II	44154	N	N Э																										
	38976	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N Э																
	43764	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N Э							
	39029	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
III	41876	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N Э																
	38429	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N Э

Примечание: N – норма; P – отклонение от физиологической нормы; Э – эвтаназия.

Таблица 5.

Данные термометрии экспериментальных животных, °С

Группа	№ обезьяны	День эксперимента																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
I	42716	38,5	38,7																											
	42884	38,3	38,4	38,0	38,1	38,5	38,5	38,2	38,5	38,7	38,5	38,7	38,7																	
	43389	38,6	38,4	38,6	38,7	38,3	38,4	38,5	38,4	38,2	38,5	38,5	38,4	38,6	38,8	38,0	38,1	38,0	38,7	38,5	38,5	38,4								
	43419	38,5	38,4	38,4	38,7	38,6	38,5	38,7	38,4	38,5	38,5	38,2	38,3	38,8	38,0	38,2	38,7	38,8	38,7	38,5	38,5	38,6	38,7	38,4	38,5	38,2	38,3	38,4	38,5	
II	44154	38,3	38,2																											
	38976	38,6	38,3	38,5	38,5	38,7	38,4	38,4	38,5	38,2	38,3	38,6	38,4																	
	43764	38,4	38,4	38,5	38,6	38,3	38,5	38,5	38,6	38,7	38,4	38,6	38,7	38,3	38,4	38,5	38,4	38,4	38,7	38,4	38,7	38,6								
	39029	38,6	38,3	38,6	38,2	38,3	38,3	38,4	38,0	38,1	38,3	38,5	38,7	38,4	38,5	38,5	38,2	38,3	38,8	38,5	38,4	38,5	38,5	38,3	38,2	38,3	38,5	38,2	38,5	
III	41876	38,7	38,3	38,4	38,5	38,4	38,5	38,5	38,2	38,3	38,4	38,7	38,6																	
	38429	38,6	38,3	38,6	38,5	38,4	38,4	38,3	38,4	38,0	38,1	38,3	38,4	38,4	38,2	38,5	38,4	38,5	38,2	38,5	38,6	38,3	38,5	38,6	38,3	38,5	38,4	38,0	38,1	

Согласно результатам гистологического исследования ЦНС обезьян группы I, в зависимости от периода наблюдения (2-е, 12-е, 21-е и 28-е сутки) были выявлены как единичные дистрофические изменения нейронов, так и наличие множественных васкулитов и инфильтратов в различных отделах головного и спинного мозга животных (табл.6).

Таблица 6.

Оценка интенсивности патоморфологических изменений в исследуемых отделах ЦНС экспериментальных приматов в баллах

Группа	№ обезьяны	Интенсивность патоморфологических изменений в баллах														Средний балл
		Условные обозначения отделов ЦНС приматов, подлежащих гистологическому исследованию														
		Отделы головного мозга												отделы спинного мозга		
		Л	А	Д	Г	Т	V	НР	З	xxxx	xxx	xx	x	ш.о.	п.о.	
I	42716	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
	42884	3	3	3	4	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3,0
	43389	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1,8
	43419	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	0	1,3
II	44154	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
	38976	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3
	43764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	39029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
III	41876	1	1	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
	38429	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0

Примечание: Л – лобная зона коры; А – передние рога боковых желудочков и отделы подкорковых ганглиев; головка хвостатого ядра, передняя ножка внутренней капсулы, чечевицеобразное ядро; Д – двигательная зона коры; Г – центральные части боковых желудочков, третий желудочек, хвостатое ядро, таламус, внутренняя капсула, чечевицеобразное ядро; Т – теменная зона коры; V – центральные части боковых желудочков и третий желудочек, тело хвостатого ядра, ядра таламуса, задняя ножка внутренней капсулы; НР – гиппокамп, нижние рога боковых желудочков; З – затылочная зона коры; Зр – задние рога боковых желудочков; xxxx – сильвиев водопровод, чёрное вещество, ядра среднего мозга; xxx – оральная часть четвёртого желудочка, собственные ядра Варолиева моста и расположенные в нем участки проводящих путей; xx – центральная часть четвёртого желудочка, ядра и участки проводящих путей, расположенные в дне ромбовидной ямки; x – каудальная часть четвёртого желудочка, ядра олив, ретикулярная формация, ядра черепно-мозговых нервов, участки проводящих путей; ш.о. – шейный отдел спинного мозга: ядра серого вещества и проводящие пути белого вещества; п.о. – поясничный отдел спинного мозга.

Согласно результатам гистологического исследования ЦНС обезьян, инокулированных вакцинным штаммом «Орлов-В» (группа II) и вакцинным штаммом RA27/3 (группа III) отмечено отсутствие умеренных и выраженных дегенеративных изменений в головном и спинном мозге животных. Средний балл поражений ЦНС составил от 0,0 до 0,5 (табл. 6).

Согласно результатам гистологического исследования внутренних органов обезьян, во всех исследуемых тканях выраженных патологических изменений выявлено не было. У обезьяны № 42884, зараженной диким штаммом «Орлов-14» и умерщвленной на 12-е сутки были обнаружены признаки активации затылочных, заднешейных и поднижнечелюстных лимфатических узлов. У животных № 43389 и № 43419 зараженных диким штаммом «Орлов-14» и умерщвленных на 21-е и 28-е сутки, соответственно, были обнаружены признаки активации только в поднижнечелюстных лимфатических узлах.

Иммуноферментный анализ.

Предварительный скрининг животных показал, что все обезьяны были серонегативными. В частности, ни одна из обезьян не имела концентрацию IgG ≥ 10 МЕ/мл до заражения диким «Орлов-14» и вакцинными «Орлов-В» и RA 27/3 штаммами вируса краснухи.

Согласно результатам ИФА у животных №42716 и №44154, интрацеребрально инокулированных диким штаммом «Орлов-14» и вакцинным штаммом «Орлов-В», соответственно, на 2-е сутки эксперимента не было отмечено появление IgG к вирусу краснухи.

Таблица 7

Таблица 24 - Количественное определение IgG к вирусу краснухи в сыворотке крови обезьян методом твердофазного иммуноферментного анализа

№ обезьяны	Штамм вируса	Срок эксперимента	Концентрация IgG, МЕ/мл	
			«ВекторРубелла-IgG» АО «Вектор-бест»	«ИФА-Краснуха-IgG» НПО «Эколаб-диагностика»
42716	Орлов-14	2-е сутки	0	0
42884		12-е сутки	180	112
43389		21-е сутки	> 200	165
43419		28-е сутки	180	160
44154	Орлов-В	2-е сутки	0	0
38976		12-е сутки	25	10
43764		21-е сутки	114	72

39029		28-е сутки	60	н/д
41876	РА 27/3	12-е сутки	10	0
38429		28-е сутки	69	н/д

Примечание: н/д – сыворотка не исследовалась.

При исследовании сывороток крови обезьян, у животных группы I, зараженных диким штаммом «Орлов-14» через 12-28 дней после инокуляции, вирусспецифические антитела определялись в концентрации 180 – >200 МЕ/мл (табл. 7). В то же время у животных группы II, зараженных вакцинным штаммом «Орлов-В» концентрация IgG в сыворотке крови на 12 – 21 сутки была ниже, и составила 25 – 114 МЕ/мл. У животного № 41876, зараженного вакцинным штаммом РА 27/3, на 12-е сутки после инокуляции при использовании тест-системы «ИФА-Краснуха-IgG» (НПО «Эколаб-диагностика», г. Электрогорск) не было отмечено появления иммуноглобулинов класса G к вирусу краснухи, однако при определении концентрации IgG в сыворотке крови с помощью набора «ВекторРубелла-IgG» (АО «Вектор-бест», Новосибирск) концентрация антител составила 10 МЕ/мл. При этом следует отметить факт обнаружения IgM в сыворотке крови данного животного, реактивность сыворотки составила 0,361 ОП450.

Культуральный метод.

Выявление инфекционного вируса в исследуемых отделах ЦНС и периферических органов обезьян проводили стандартным методом по цитопатическому действию (ЦПД). У животных группы I, вирус был выявлен только у 3 обезьян (№ 42716, № 42884 и № 43389), при этом у животного № 43419, умерщвленного на 28-е сутки после заражения, инфекционный вирус не выявлен ни в ЦНС, ни в периферических органах.

Среди обезьян группы II, инфекционный вирус был выявлен в низком титре только в головном мозге у обезьяны № 44154, умерщвленной на 2-е сутки после заражения.

Согласно результатам вирусологического исследования у обезьяны № 41876, умерщвленной на 12-е сутки после заражения, инфекционный вирус не был выделен ни в одном из исследуемых образцов.

ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Таблица 8

Результаты выявления РНК вируса краснухи (Rubella virus) в аутопсийном материале от обезьян интрацеребрально инокулированных диким штаммом «Орлов-14» вируса краснухи

№ обезьяны	День эвтаназии	Исследуемый образец	Сt
------------	----------------	---------------------	----

42716	2-е сутки	головной мозг	26,69
		шейный отдел спинного мозга	38,32
		поясничный отдел спинного мозга	-
		ЦСЖ	-
		плазма	-
42884	12-е сутки	головной мозг	30,42
		шейный отдел спинного мозга	34,61
		поясничный отдел спинного мозга	36,35
		ЦСЖ	27,18
		лим. узлы подчелюстные	-
		лим. узлы задне- шейные	27,12
		легкое	-
		селезенка	27,20
		печень	-
		плазма	27,10
		43389	21-е сутки
шейный отдел спинного мозга	-		
поясничный отдел спинного мозга	-		
ЦСЖ	-		
лим. узлы подчелюстные	26,71		
лим. узлы задне- шейные	33,34		
легкое	-		
селезенка	27,03		
печень	-		
плазма	33,52		
43419	28-е сутки	головной мозг	-
		шейный отдел спинного мозга	-
		поясничный отдел спинного мозга	-
		ЦСЖ	-
		лим. узлы подчелюстные	-
		лим. узлы задне- шейные	-
		легкое	-
		селезенка	-
		печень	-
		плазма	-

Как видно из таблицы 8, у животных группы I, РНК вируса краснухи была выявлена в головном мозге и шейном отделе спинного мозга у обезьяны № 42716, умерщвленной на 2-е сутки после заражения диким штаммом вируса краснухи. У животного № 42884 на 12-е сутки после инокуляции РНК была обнаружена в головном мозге, шейном и поясничном отделах спинного мозга, ЦСЖ, заднешейном лимфатическом узле, а также в селезенке и плазме крови. У обезьяны № 43389, умерщвленной на 21 сутки эксперимента, РНК выявлена в подчелюстных и заднешейных лимфатических узлах, селезенке и плазме крови. У обезьяны № 43419, подвергнутой эвтаназии на 28-е сутки после заражения, ни в одном из исследуемых образцов не было выявлено РНК вируса краснухи.

У животных группы II, зараженных вакцинным штаммом «Орлов-В», РНК вируса краснухи была выявлена только в головном мозге у обезьяны № 44154, умерщвленной на 2-е сутки после инокуляции.

У обезьян, зараженных вакцинным штаммом RA 27/3 и подвергнутыми эвтаназии на 12-е и 30-е сутки эксперимента, ни в одном из исследуемых образцов не было выявлено РНК вируса краснухи.

Выводы

1. Результаты проведенного исследования показали отсутствие тератогенных свойств в условиях данного эксперимента как у вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В», так и у штамма RA27/3, использованного в качестве препарата сравнения и входящего в состав коммерческих вакцин против краснухи.
2. Показана информативность ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие тератогенных свойств вакцинных штаммов для живых вирусных вакцин на этапе их доклинического изучения.
3. Изучение остаточной нейровирулентности вакцинного штамма вируса краснухи в тесте интрацеребральной инокуляции обезьян показало высокий уровень аттенуации штамма «Орлов-В»
4. Сравнительное изучение нейровирулентности низкоаттенуированного и вакцинных штаммов вируса краснухи, показало отсутствие остаточной нейровирулентности как у отечественного вакцинного штамма «Орлов-В», так и у штамма RA 27/3, входящего в состав коммерческих культуральных живых вакцин.
5. Изучены локализации и степени выраженности морфологических изменений в ЦНС обезьян, интрацеребрально инокулированных вакцинными и

низкоаттенуированным штаммами вируса краснухи. Полученные результаты могут служить морфометрическими параметрами, отражающими низкий уровень аттенуации штаммов вируса краснухи.

6. Показана информативность метода ПЦР-РВ при контроле диссеминации аттенуированных штаммов и возможность использования ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при оценке специфической безопасности аттенуированных штаммов живых вакцин.

Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы:

1. **Шамсутдинова О.А.**, Лаврентьева И.Н., Чикобава М.Г., Леонтьук А.В. Использование ПЦР в доклиническом контроле безопасности вакцинного штамма вируса краснухи / Мат. науч.–практ. конф. «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций», СПб, 23-25 апреля 2014.// Инфекция и иммунитет, 2014. – Т.4. - №1. С.98.
2. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Жербун А.Б., Агрба В.З., Яковлева Л.А., Карал-оглы Д.Д., **Шамсутдинова О.А.** Перспективы создания вакцины против краснухи на основе штамма «Орлов-В» / Мат. юбил. науч.–практ. конф. «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, СПб, 25-27 июня 2014.// Цитокины и воспаление, 2014. – Т.13. - №1. С.105 – 106.
3. **Шамсутдинова О.А.**, Лаврентьева И.Н. Подтверждающие тесты в доклинических испытаниях штаммов для живых противокраснушных вакцин Мат. юбил. науч.–практ. конф. «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, СПб, 25-27 июня 2014.// Цитокины и воспаление, 2014. – Т.13. - №1. С.132.
4. **Шамсутдинова О.А.**, Лаврентьева И.Н., Агрба В.З. ПЦР как информационный тест в доклиническом изучении специфической безопасности живых вакцин в опыте на обезьянах макака-резус / Мат. Сочинской третьей межд. Науч. конф. «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии», Сочи, 8-10 августа 2016 // ФГБНУ «НИИ МП», 2016. – Т.1. – С. 213-218.
5. **Шамсутдинова О.А.** Живые аттенуированные вакцины для иммунопрофилактики // Инфекция и иммунитет, 2017. – Т.7. - №2. С. 107-116.
6. Лаврентьева И.Н., Вышемирский О.И., Агрба В.З., Сухобаевская Л.П., Гвоздик Т.Е., Леонтьук А.В., Карал-оглы Д.Д., **Шамсутдинова О.А.**, Симавонян К.В. Изучение тератогенности вакцинных штаммов вируса краснухи в эксперименте на обезьянах макака-резус / Мат. Сухумской межд. науч.–практ. конф. «Актуальные

вопросы экспериментальной биологии и медицины», Сухум, Абхазия, 20-22 сентября 2017. – С. 124-135.

7. **Шамсутдинова О.А.**, Агрба В.З., Лаврентьева И.Н. Возможность использования ПЦР в режиме реального времени в качестве дополнительного теста при доклиническом контроле остаточной нейровирулентности аттенуированных штаммов вируса краснухи / Мат. межд. науч.-прак. конф. «Молодые ученые в медицине и биологии», Сочи, 18-19 апреля 2019 // ФГБНУ «НИИ МП», 2019. – С. 151 – 157.
8. Лаврентьева И.Н., **Шамсутдинова О.А.**, Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д. Маркеры аттенуации вируса краснухи в эксперименте на лабораторных приматах / Сборник тезисов межд. науч. конф. «Инновационные исследования в биологии и медицине», Сочи, 25-27 ноября 2020 // ФГБНУ «НИИ МП», 2019. – С. 70 – 71.
9. **Шамсутдинова О.А.**, Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Сравнительная характеристика методов оценки специфической безопасности штаммов для живых вакцин в доклинических экспериментах / Сборник тезисов межд. науч. конф. «Инновационные исследования в биологии и медицине», Сочи, 25-27 ноября 2020 // ФГБНУ «НИИ МП», 2019. – С. 130 – 131.
10. **Шамсутдинова О.А.**, Лаврентьева И.Н., Карал-оглы Д.Д. ПЦР-РВ как дополнительный тест при оценке специфической безопасности аттенуированных штаммов вируса краснухи в опыте на обезьянах макака-резус / VII Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2020: сб. тез. / АНО «Иннов. центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2020. – С. 362 – 364.
11. Лаврентьева И.Н., **Шамсутдинова О.А.**, Чугуева И.И., Карал-оглы Д.Д., Вышемирский О.И. / Изучение тератогенности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» (Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus) в опыте на обезьянах макак-резус. // Вопросы вирусологии, том 65, №6, 2020, стр.357-363
12. **Шамсутдинова О.А.**, Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Изучение морфологических изменений в ЦНС и внутренних органах обезьян *Macaca mulata* при интрацеребральном введении низкоаттенуированного штамма вируса краснухи / Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2021. - Т.171. - №5.- С.651-655