

На правах рукописи



Гаврилова Юлия Кирилловна

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОНТРОЛЯ УРОВНЯ
ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ НА МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ
КУЛЬТУР В ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО
ИММУНОГЛОБУЛИНА**

Специальность 1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель

Генералов Сергей Вячеславович, кандидат биологических наук (1.5.6. Биотехнология), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Клюкина Валентина Ивановна, доктор биологических наук (1.5.6. Биотехнология), профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», отдел иммунологии, заведующая отделом, Московская область, Щелковский район, поселок Биокомбината

Сизикова Татьяна Евгеньевна, кандидат биологических наук (6.2.10. Поражающее действие специальных видов оружия, средства и способы защиты), Федеральное государственное бюджетное учреждение «48-й Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», 1 научно-исследовательский испытательный отдел, научный сотрудник, Московская область, г. Сергиев Посад

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита состоится «15» апреля 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Бешенство представляет собой остропротекающее заболевание зоонозной природы, вызываемое нейротропным вирусом рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Болезнь распространена в более чем 150 странах мира и представляет смертельную опасность для человека и теплокровных животных (Макаров В.В., 2017; Онищенко Г.Г. и др., 2017; Грибенча С.В. и др., 2013). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), каждый год в мире от данного заболевания погибает около 60 тыс. человек (WHO, Technical Report Series 1012, 2018). В России, несмотря на наличие тенденции к снижению случаев бешенства среди людей, сохраняется напряженная эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка (О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад, 2021). По данным Роспотребнадзора в учреждения здравоохранения Российской Федерации (РФ) по причине укусов и повреждений, полученных при контакте с животными, ежегодно обращается около 450 тыс. человек и более половины из них впоследствии получает лечение антирабическими препаратами (Онищенко Г.Г. и др., 2017; Мовсисянц А.А. и др., 2015). Принятие своевременных мер постэкспозиционной профилактики в настоящее время является эффективным путем сокращения случаев заражения людей бешенством. При многочисленных или глубоких повреждениях, а также повреждениях опасной локализации, курсу иммунизации антирабической вакциной предшествует введение препарата антирабического иммуноглобулина (АИГ), включенного в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. На сегодняшний день ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» является единственным производителем антирабического иммуноглобулина на территории России.

О защитных свойствах АИГ свидетельствует значение его «специфической активности». При производстве гетерологичного АИГ из сыворотки крови лошади специфическую активность препарата определяют в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства (ВБ) на белых мышах (*in vivo*) (ФС.3.3.1.0038.15, 2018). Основными характеристиками данного метода является высокая чувствительность, специфичность, длительность постановки (14 сут), необходимость использования большого количества стандартных лабораторных животных и наличия вивариев. Ввиду указанных особенностей метода актуален поиск альтернативных способов определения уровня антирабических антител при производстве гетерологичного АИГ. Отказ от использования лабораторных животных и переход на методы *in vitro* при определении показателей качества антирабических иммунобиологических лекарственных препаратов являются основными факторами гармонизации российских и международных фармакопейных документов (Мовсисянц А.А. и др., 2016). Актуальность разработки и применения методов *in vitro* для определения специфической активности в производстве АИГ также обоснована рекомендациями экспертов ВОЗ по бешенству (WHO, Technical Report Series 982, 2013; Series 1012, 2018).

По мнению ВОЗ, альтернативой РН *in vivo* являются методы, основанные на детекции ВБ в клеточных культурах с применением флуоресцирующих антирабических конъюгатов, такие как RFFIT (rapid fluorescent foci inhibition test) и FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralization test) (Meslin F.X. et al., 1996; Rupprecht Ch.E. et al., 2015; Human rabies immunoglobulin, monograph 01/2015:0723. European Pharmacopoeia 10th ed., 2019). Тесты схожи по принципу работы, позволяют получать сопоставимые результаты, однако несколько отличаются в методологическом отношении (Лобанова В.А. и др., 2021). В российской и зарубежной литературе описаны модификации RFFIT и FAVN-теста, отличающиеся схемой постановки, используемыми клеточными культурами и вирусными штаммами. Предлагаемые модификации позволяют улучшить метрологические характеристики указанных методов за счет использования пероксидазных конъюгатов моноклональных антител (Hostnik P., 2000), устранения цитотоксического эффекта в случае исследования образцов ненадлежащего качества (Bedekovic T. et al., 2013), предварительной

обработки клеточной культуры DEAE-декстраном, способствующей эффективному связыванию вируса с клеткой (Timiryasova T.M. et al., 2019). Использование других клеточных культур и штаммов вируса бешенства позволило расширить применение методических приемов *in vitro* в сфере диагностики бешенства и производства антирабических вакцин (Вишняков И.Ф. и др., 1997; Баркова И.П. и др., 2013; Хисматуллина Н.А. и др., 2014), повысить биологическую безопасность в результате применения непатогенных штаммов вируса бешенства или близкородственных вирусов (Moeschler S. et al., 2016; Nie J. et al., 2017). Другим аспектом модифицирования метода иммунофлуоресценции с применением культур клеток является сокращение времени анализа за счет исключения этапа окрашивания инфицированных клеточных культур ввиду использования штаммов, способных к продукции флуоресцирующего белка (Qin Sh. et al., 2019). Тем не менее, разработка и применение флуоресцирующих конъюгатов, отличающихся специфичностью связывания и высокой флоростабильностью, остается актуальной. В настоящее время на территории России и за рубежом производят диагностические конъюгаты антирабических антител с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), которые успешно применяют для детекции ВБ и определения антирабических антител в сыворотках крови животных (Хисматуллина Н.А. и др., 2014). При разработке конъюгатов предпочтительно использование антител к генетически стабильным субъединицам вируса бешенства – нуклеопротеину (Carogale G.M.M. et al., 2009; Грибенча С.В. и др., 2013; Silva G.H. et al., 2020) и фосфопротеину (Um J. et al., 2017), а также флуорохромных красителей с высокой флоростабильностью (Грибенча С.В. и др., 2013; Um J. et al., 2017). Использование нуклеопротеина, очищенного или представленного комплексом с рибонуклеиновой кислотой, является перспективным при разработке высокочувствительных диагностикумов для обнаружения вируса бешенства благодаря стабильности его аминокислотной последовательности по сравнению с другими белками ВБ (Грибенча С.В. и др., 2013; Carogale G.M.M. et al., 2009). Получение подобных продуктов требует проведения научных исследований по совершенствованию методов культивирования, разработке питательных сред для выращивания вируса и клеточных культур, иммунизации животных, выделению и очистке антигенов и антител (Грибенча С.В. и др., 2013; Silva G.H. et al., 2020).

В настоящем исследовании в качестве контрольного штамма предлагается использование вируса бешенства, полученного в результате адаптации производственного фиксированного штамма «Москва 3253» к росту на перевиваемой культуре Vero (Абрамова Е.Г. и др., 2016). Обосновать указанный выбор позволяет наличие существенных отличий в геноме данного штамма в сравнении с исходным (Краснов Я.М. и др., 2020).

Неотъемлемым компонентом аналитической системы, кроме метода контроля, является стандартный образец (Волкова Р.А. и др., 2017). В процессе разработки метода контроля возможно использование первичных стандартных образцов. Поскольку первичные образцы, прежде всего, являются эталонами сравнения, существует необходимость в получении вторичных стандартов для применения в рутинных исследованиях (Timiryasova T.M. et al., 2020).

Актуальность темы разработки метода контроля содержания антирабических антител *in vitro* для применения в производстве АИГ, являющегося альтернативой методу *in vivo*, позволила сформулировать соответствующие цель и задачи настоящего исследования.

Цель работы: разработка метода *in vitro* с использованием клеточных культур, перспективного для контрольных исследований специфической активности антирабических сывороток и препарата антирабического иммуноглобулина.

Задачи исследования:

1. Выделить рибонуклеопротеин из цитоплазмы инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}» культуры Vero, охарактеризовать его физико-химические свойства и экспериментально обосновать использование питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина при культивировании указанной культуры для повышения выхода рибонуклеопротеина.

2. Разработать эффективную схему иммунизации животных с целью получения иммунных сывороток и выделения антител к рибонуклеопротеину штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}».

3. Получить флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}» и исследовать возможность их применения наряду с коммерческим флуоресцирующим антирабическим конъюгатом.

4. Экспериментально обосновать оптимальные условия определения вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на модели клеточных культур.

5. Разработать и аттестовать стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре.

6. Сравнить результаты исследования образцов антирабических сывороток и иммуноглобулина по показателю «специфическая активность» методом *in vivo* и разработанным методическим приемом *in vitro*.

Научная новизна.

Впервые разработан методический подход *in vitro* с применением штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» и перевиваемой клеточной линии Vero, позволяющий осуществлять количественное определение уровня специфических антител в антирабических сыворотках и готовом препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Для выявления вируса бешенства впервые предложено использование конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» с флуоресцентной меткой Alexa Fluor (532 нм). Длительность проведения анализа короче по сравнению с реакцией нейтрализации *in vivo* (3 сут против 14 сут). Указанные особенности метода позволяют рекомендовать его для проведения контрольных исследований в производстве антирабического иммуноглобулина.

Впервые изучены особенности роста интактной и инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}» культуры Vero при использовании питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина, такие как характер формирования монослоя, индекс пролиферации, динамика накопления вируса в клеточной культуре. Приоритет исследований подтвержден патентом РФ 2673718 «Питательная среда для культивирования перевиваемых клеточных линий млекопитающих» (опубликован 29.11.2018 г., бюл. № 34). Результаты исследований позволили обосновать выбор питательной среды, используемой для культивирования инфицированных клеточных культур с целью получения рибонуклеопротеина вируса бешенства.

Впервые предложена схема иммунизации кроликов рибонуклеопротеином вируса бешенства с наночастицами коллоидного золота в качестве адьюванта, позволившая получить сыворотки с высоким содержанием антител (1:25600) к рибонуклеопротеину вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}».

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что научно подтверждена возможность использования на этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина новых методических приемов определения показателя «специфическая активность» с целью сокращения срока исследования и исключения необходимости использования большого количества стандартных лабораторных животных. Изложенные в диссертации результаты служат теоретической основой для исследований, целью которых является совершенствование контроля этапов производства антирабических препаратов.

Основным практически значимым итогом диссертации является разработка метода контроля специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с применением клеточной культуры и вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» в производстве препарата антирабического иммуноглобулина. Эффективность разработанного метода

подтверждена согласованностью результатов исследования, полученных указанным методом *in vitro*, с результатами контрольного метода определения специфической активности препарата антирабического иммуноглобулина – реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах. Применение разработанного метода позволяет сократить срок проведения контрольных исследований антирабического иммуноглобулина по показателю «специфическая активность» с 14 до 3 сут, исключив при этом использование стандартных лабораторных животных, а также увеличить количество одновременно исследуемых образцов при проведении анализа.

Экспериментально обосновано применение питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина для культивирования клеточных культур и вируса бешенства с целью получения рибонуклеопротеина, что будет способствовать развитию применения малоотходных технологий.

Установлена эффективность применения наночастиц коллоидного золота в качестве адъюванта при иммунизации кроликов рибонуклеопротеином, с целью получения сывороток с высоким титром антител, необходимых для конструирования диагностических конъюгатов. Сконструированы конъюгаты флуоресцирующих антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства для определения титра антител в антирабических сыворотках и иммуноглобулине в реакции нейтрализации вируса на клеточной культуре, сопоставимые по эффективности применения с коммерчески доступным диагностическим антирабическим конъюгатом.

Разработан и аттестован стандартный образец предприятия (серия 41-01-20) специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре, предназначенный для исследований, целью которых является внедрение разработанного метода *in vitro* в производство препарата антирабического иммуноглобулина (учрежденческий уровень внедрения). Разработанный стандартный образец внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Разработана и утверждена директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Инструкция по применению на стандартный образец предприятия специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток» (1.12.2020).

На основании результатов исследований составлены методические рекомендации учрежденческого уровня:

«Выделение нуклеопротеина из аттенуированного вируса бешенства» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб». Протокол № 5 от 19.12.2017);

«Определение специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методом иммунофлуоресценции на клеточных культурах» (одобрены Ученым Советом и утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб». Протокол № 4 от 6.06.2018).

Методология и методы исследования. Предметом исследования явился метод иммунофлуоресценции с использованием клеточных культур, предназначенный для определения вируса бешенства и антител к нему. Основными объектами исследования явились штамм вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», адаптированный к росту на перевиваемой линии Vero, клеточные культуры Vero и ВНК-21, антирабические сыворотки (АРС) крови лошадей-продуцентов, препарат АИГ из сыворотки крови лошади (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), процессы культивирования вируса бешенства и клеточных культур, иммунизации животных, выделения и очистки рибонуклеопротеина и антител к нему, получения флуоресцирующих конъюгатов. Теоретической базой работы явились исследования российских и зарубежных ученых, материалы нормативной документации по разработке методов определения вируса бешенства и антител к нему и его компонентам, а также иммунизации животных, получения флуоресцирующих конъюгатов антител. При выполнении работы применяли биотехнологические, вирусологические, биологические,

биохимические, биофизические, физико-химические, иммунохимические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Использование питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина при выращивании инфицированной вирусом бешенства культуры клеток позволяет увеличить выход рибонуклеопротеина, выделяемого из клеточной культуры в $(1,45 \pm 0,05)$ раза по сравнению с использованием коммерческих сред.

2. Применение наночастиц коллоидного золота в качестве адъюванта в 2 раза повышает уровень антител при иммунизации кроликов рибонуклеопротеином вируса бешенства по сравнению с уровнем антител при иммунизации с применением полиоксидония в качестве адъюванта либо без использования адъюванта.

3. Антитела к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Verо}», конъюгированные с флуорохромными красителями флуоресцеинизотиоцианатом либо Alexa Fluor (532 нм), не уступают коммерческим флуоресцирующим конъюгатам антирабического иммуноглобулина при обнаружении вируса бешенства на клеточных культурах.

4. Методический прием, особенностью которого является использование клеточной культуры Verо, вируса бешенства «Москва 3253_{Verо}» и флуоресцентных конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства, позволяет определять уровень вируснейтрализующих антител в иммунных сыворотках и антирабическом иммуноглобулине.

5. Высокая корреляция и согласованность результатов определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина, полученных предлагаемым и нормативным методами, подтверждают возможность использования аналитической системы, включающей разработанный методический прием и стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток, для контрольных исследований на этапах производства препарата.

Степень достоверности основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены на аттестованном оборудовании, контрольно-измерительные приборы, задействованные в ходе исследования, прошли метрологическую поверку.

Апробация результатов. Материалы диссертации представлены на: Международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии» (Саратов, 2017); Всероссийском семинаре памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения» (Саратов, 2017); XXII Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018); X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 2018); ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2017, 2018, 2020); Всероссийской научно-практической конференции «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы» (Нижний Новгород, 2021); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека» (Омск, 2021); XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 2021).

Личный вклад автора. Совместно с руководителем к.б.н. Генераловым С.В. соискатель определил цели и задачи работы, методику экспериментов, а также подготовил

материалы к публикации. Личное участие автора заключалось в нахождении эффективных решений поставленных задач, постановке экспериментов и интерпретации результатов, оформлении научных статей, патента на изобретение, разработке методических документов, написании текстов диссертации, автореферата. Некоторые экспериментальные исследования проведены вместе с д.б.н. Абрамовой Е.Г., к.м.н. Киреевым М.Н., к.б.н. Овчинниковой М.В., к.б.н. Лобовиковой О.А., к.б.н. Уткиным Д.В., к.б.н. Шараповой Н.А., Кирилловой Т.Ю., Спицыным А.В., Холматовым К.И., Волосевич В.В., Савицкой Л.В.

Связь работы с научными программами. Работа выполнена на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в период с 2015 по 2021 гг. в рамках отраслевых НИР: 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (номер госрегистрации 01201457722), 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1) и 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Публикации научных трудов. По материалам диссертационной работы опубликовано 16 научных работ, из которых 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение, 11 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, состоящего из 226 источников. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 5 таблицами.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Обзор литературы (глава 1)

В обзоре литературы освещены вопросы характеристики вируса бешенства, методов детекции цельного вируса, антигенов и антирабических антител, применяемых в области экспериментальных исследований, диагностики бешенства и производства антирабических медицинских препаратов, а также особенностей культивирования вируса в клеточной культуре с использованием различных питательных сред. Изучен вопрос применения и необходимости разработки стандартных образцов предприятия в производстве антирабического иммуноглобулина.

2.2 Материалы и методы исследования (глава 2)

В работе использовали штамм вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», полученный путем многократных пассажей (пассаж 180) на клеточной культуре Vero из штамма вируса бешенства «Москва 3253», и фиксированный вирус бешенства «CVS». Штаммы ВБ «Москва 3253» и «CVS» (III группа патогенности) получены из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва. При разработке метода контроля уровня вируснейтрализующих антител в условиях *in vitro* использовали клеточные культуры Vero (В) (170-180 пассаж) и ВНК-21 (неопределенный пассаж). Обе клеточные линии были получены из коллекции Биолот (Россия), предварительно исследованы на отсутствие микоплазм. Кроликов породы «Шиншилла» весом 1,5-2,5 кг использовали в качестве продуцентов сыворотки, содержащей антитела к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}». При постановке классической РН вируса бешенства в условиях *in vivo* использовали белых

мышей инбредной линии BALB/c весом 10-12 г. Лошадей рысистой породы массой не менее 400 кг использовали в качестве продуцентов иммунной антирабической сыворотки, исследуемой в реакциях нейтрализации *in vivo* и *in vitro* по показателю «специфическая активность».

В работе применяли следующие методы исследования:

биотехнологические – культивирование перевиваемых клеточных культур; культивирование вируса бешенства на клеточных культурах;

вирусологические – вычисление LD₅₀, определение титра вируса бешенства и показателя специфической активности АИГ;

биологические – иммунизация животных, забор крови методом тотального обескровливания;

биохимические, биофизические, физико-химические и иммунохимические методы – выделение рибонуклеопротеина вируса бешенства; определение концентрации водородных ионов в растворе; электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; определение содержания белка; выделение сыворотки крови; дот-иммуноанализ (ДИА); иммуноферментный анализ (ИФА); осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония; получение конъюгата антител к рибонуклеопротеину с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм); люминесцентная микроскопия;

статистические – вычисление титра антител и инфицирующих доз (lg LD₅₀ и lg ID₅₀) вируса бешенства проводили по методу Рида и Менча; обработку результатов, полученных при разработке стандартного образца предприятия специфической активности АИГ, осуществляли в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами»; сравнение результатов исследования активности в тестах *in vitro* и *in vivo* методом Блэнда-Алтмана и методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона. Вычисления осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel 2010 и «Программы для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышцах по методу Рида и Менча» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия, свидетельство о государственной регистрации № 2016617051).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные исследования изложены в 3 главах работы.

В **главе 3** изложены исследования, посвященные получению рибонуклеопротеина (РНП) ВБ «Москва 3253_{Vero}», антител к нему и конструированию на основе полученных антител флуоресцирующих конъюгатов. Получение антител из инфицированной ВБ клеточной культуры Vero осуществляли по модифицированному методу M. Dastkhosh. Способ позволил получить растворы, содержащие РНП в концентрации от 0,01 до 0,2 мг/мл в зависимости от количества клеток в исходном материале. С целью увеличения срока хранения, а также приготовления более концентрированных растворов, полученный РНП подвергали лиофилизации. Лиофилизат представлял собой пористую массу белого цвета, хорошо растворимую в воде и водных буферных растворах. Лиофильно высушенную субстанцию РНП хранили при 4 °С.

Результаты электрофоретических исследований в полиакриламидном геле (12 % ПААГ-ДСН), свидетельствовали об отсутствии примесей в полученных образцах РНП, ориентировочная молекулярная масса исследуемых образцов составила около 55 кДа (рисунок 1), что соответствует данным литературы (Львов Д.К., 2008). Лиофилизация не оказала повреждающего воздействия на структуру молекулы РНП: показатели электрофоретической однородности и ориентировочное значение молекулярной массы остались неизменны.

Для увеличения выхода РНП из инфицированной клеточной культуры был проведен подбор питательных сред для культивирования клеток и вируса бешенства. Культивирование вируса осуществляли на клеточной культуре Vero с использованием коммерческой среды, а также экспериментальной среды, приготовленной на основе ферментативного гидролизата

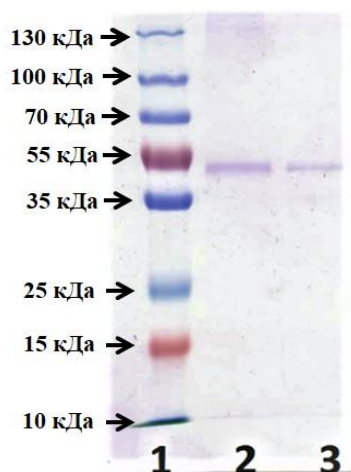


Рисунок 1. Электрофореграмма рибонуклеопротеина вируса бешенства

1. Маркеры молекулярных масс
2. Очищенный регидратированный рибонуклеопротеин вируса бешенства
3. Очищенный рибонуклеопротеин вируса бешенства в исходном растворе

фибрина (ФГФ) крови лошадей. В качестве ростовой добавки использовали сыворотку крови крупного рогатого скота (КРС). Изучение возможности применения питательной среды на основе ФГФ при культивировании клеток и вируса связано с поиском способа снижения стоимости исследований, поскольку фибрин крови лошади представляет собой отход производства гетерологичного АИГ.

Для приготовления экспериментальной питательной среды использовали белковую основу в виде высушенного ФГФ, полученного и охарактеризованного в соответствии с результатами, представленными ранее исследователями ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Жулидов И.М. и др., 2011). С целью определения оптимальной концентрации белковой основы готовили экспериментальные среды, с концентрациями 0,05; 0,1, 0,25; 0,5 % ФГФ. Затем исследовали характер роста интактной культуры Vero, включающий значение индекса пролиферации, сроки образования и сохранения монослоя. В качестве контрольной среды применяли среду Игла MEM. Исходная концентрация клеток соответствовала $(5 \pm 2) \times 10^4$ клеток/мл. Исследуемые параметры для клеточной культуры Vero, выращенной на среде Игла MEM и экспериментальных средах с содержанием 0,1 и 0,25 % белковой основы, оказались сопоставимы: индекс пролиферации после 5 сут выращивания составил соответственно $(15,0 \pm 0,3)$, $(15,2 \pm 0,2)$, $(14,8 \pm 0,3)$. Клетки сохраняли характерную для данного вида форму. Уменьшение концентрации белковой основы до 0,05 % приводило к снижению индекса пролиферации в течение 5 сут культивирования до $(4,6 \pm 0,4)$ и отсутствию формирования клеточного монослоя в течение срока наблюдения. При увеличении концентрации ФГФ до 0,5 % наблюдали медленный рост и изменение морфологии клеток – вытянутая форма и образование длинных отростков. На основании полученных результатов установлено, что использование среды на основе ФГФ в концентрации 0,1 и 0,25 % при культивировании клеток Vero не уступает по эффективности коммерческой питательной среде Игла MEM.

Далее исследовали репродуктивную активность ВБ «Москва 3253_{Vero}» в клеточной культуре Vero, культивируемой на экспериментальной питательной среде с сухим ферментативным гидролизатом фибрина, взятым в концентрациях 0,1 и 0,25 % с 2 и 5 % сыворотки КРС, а также на среде 199 с 5 % сыворотки КРС в качестве образца сравнения (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика репродукции вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» в клетках Vero

Питательная среда	Время культивирования, сут.	log ₂ титра вируса в ИФА	log ₂ титра вируса в реакции иммунофлуоресценции
Экспериментальная среда, содержащая 0,10 % основы ФГФ и 2 % сыворотки КРС	4	2,6±0,4	4,47±0,14
	7	3,7±0,4	4,78±0,15
Экспериментальная среда, содержащая 0,10 % основы ФГФ и 5 % сыворотки КРС	4	3,3±0,4	4,47±0,14
	7	4,0±0,3	4,84±0,17
Экспериментальная среда, содержащая 0,25 % основы ФГФ и 2 % сыворотки КРС	4	2,7±0,3	4,47±0,17
	7	4,3±0,4	4,9±0,14
Экспериментальная среда, содержащая 0,25 % основы ФГФ и 5 % сыворотки КРС	4	4,0±0,3	4,78±0,13
	7	5,3±0,4	4,9±0,21
Среда 199 и 5 % сыворотки КРС (образец сравнения)	4	3,3±0,4	4,31±0,14
	7	4,6±0,4	4,47±0,11

Примечание: значения титра вируса были получены на основании эксперимента, проведенного в пяти повторностях.

Уровень накопления ВБ в среде определяли в ИФА с использованием набора для диагностики бешенства (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия). Уровень накопления вируса в цитоплазме клеток Vero определяли методом иммунофлуоресценции с применением набора для диагностики с меткой ФИТЦ (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия).

При культивировании на экспериментальных питательных средах была отмечена тенденция к накоплению внутриклеточного ВБ. Содержание добавляемой в среду сыворотки КРС значительного влияния на процесс репродукции ВБ не оказало. При последующем культивировании вируса бешенства с целью получения РНП использовали экспериментальные питательные среды на основе ФГФ с содержанием белковой основы 0,1 и 0,25 %, а также коммерческие среды с 5 % сыворотки КРС. Вирус добавляли к клеточной суспензии в дозе 0,1 ID₅₀ на клетку. Концентрация клеток в начале культивирования составляла от 0,8×10⁵ до 1,6×10⁵ клеток/мл. Время культивирования составило до 120 ч. После каждых 24 ч культивирования из клеточной культуры выделяли РНП. Результаты исследования показали наиболее высокий выход РНП при культивировании ВБ на клетках Vero с применением питательных сред на основе сухого ФГФ, по сравнению с культивированием на коммерческих средах (рисунок 2). Оптимальное время культивирования при инфицирующей дозе 0,1 ID₅₀ составило (72±4) ч, что соответствовало времени максимального выхода РНП при использовании экспериментальных питательных сред.

Полученный РНП ВБ использовали для иммунизации кроликов с целью получения специфических сывороток. Для получения сывороток с высоким содержанием антител к

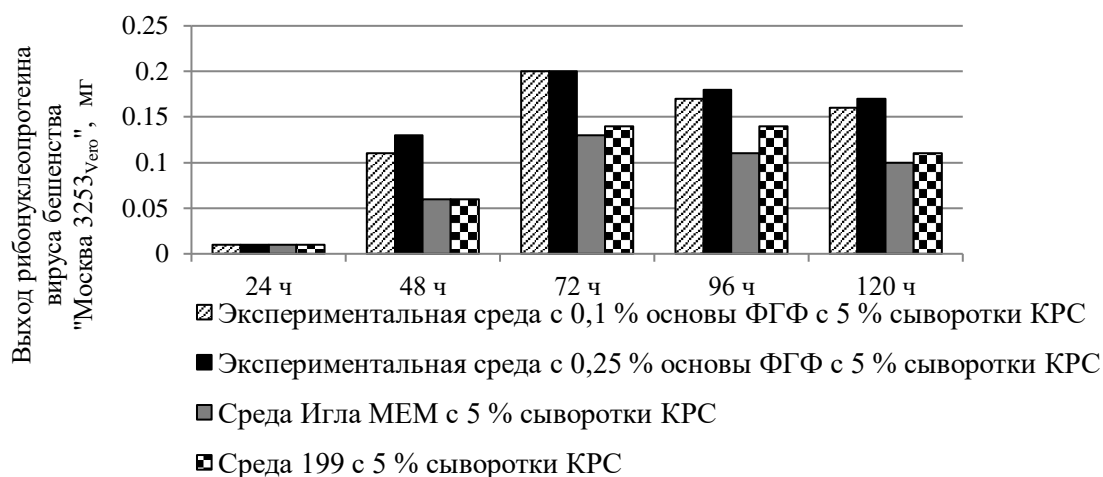


Рисунок 2. Динамика накопления рибонуклеопротеина вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» в культуре Vero в зависимости от питательной среды

Примечание: концентрация РНП указана относительно 10⁶ клеток.

РНП изучили возможность применения коллоидного золота и полиоксидония в качестве адъювантов. Исследование антителообразования проводили на трех группах животных.

Первую группу иммунизировали рибонуклеопротеином (400 мкг РНП), вторую и третью – рибонуклеопротеином с адъювантами: коллоидным золотом (наночастицы диаметром 14-17 нм; 0,14 ммоль коллоидного золота и 400 мкг РНП) и полиоксидонием (1 мг полиоксидония и 400 мкг РНП). Животным внутримышечно вводили по 1 мл антигенного материала на 0, 43 и 57 день эксперимента. Для исследования динамики антителообразования образцы крови отбирали из краевой вены уха непосредственно перед проведением иммунизации. Срок эксперимента составил 70 дней. Титр антител к РНП в собранных сыворотках определяли в ДИА с использованием антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота. Результаты проведенного исследования свидетельствовали об образовании антител к РНП у животных каждой из групп. Динамика антителообразования отображена на рисунке 3.

Наибольшее нарастание титра антител к РНП ВБ установлено в сыворотках крови от животных, иммунизированных РНП с добавлением наночастиц коллоидного золота. К 43 дню эксперимента титр антител у животных 2 группы составил 1:3200, что превышало показатели в сыворотках крови от животных 1 и 3 групп в 4 и 2 раза соответственно. При завершении иммунизации осуществляли тотальный забор крови. Полученные сыворотки консервировали раствором хинозола и выдерживали при (6±2) °С в течение месяца для стабилизации уровня антител. Наибольший титр антител к РНП ВБ, значение которого составило 1:25600, отмечали в образцах сывороток от животных, иммунизированных препаратом РНП в сочетании с коллоидным золотом (рисунок 4).

Данное обстоятельство позволило обосновать использование РНП ВБ «Москва 3253_{Vero}» с наночастицами коллоидного золота в качестве адъюванта для иммунизации кроликов для получения сывороток с высоким титром антител к РНП ВБ.

Антитела к РНП ВБ выделяли осаждением сульфатом аммония. Удаление остатков солей осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50. Концентрацию белка устанавливали в значении (22±2) мг/мл, при этом титр антител к РНП вируса бешенства составил от 1:16000 до 1:32000. Очищенные антитела использовали при получении флуоресцирующих конъюгатов для обнаружения ВБ в клеточных культурах. В качестве флуоресцентных меток применяли ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Для контроля конъюгирования антител с флуорохромами исследовали спектрофотометрические

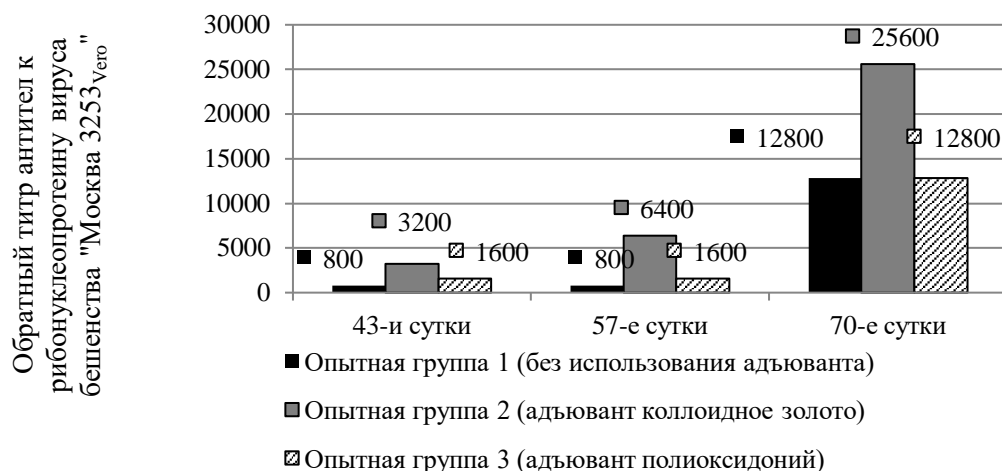


Рисунок 3. Динамика накопления антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства в сыворотках крови кроликов (дот-иммуноанализ)

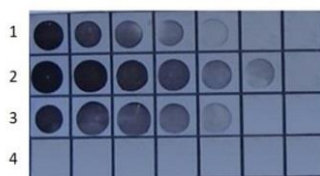


Рисунок 4. Уровень содержания антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства в сыворотках крови, полученных от продуцентов после завершения иммунизационных мероприятий (дот-иммуноанализ; двукратные разведения сывороток с 1:800)

- 1 –опытная группа 1, без адьюванта
- 2 –опытная группа 2, адьювант коллоидное золото
- 3 –опытная группа 3, адьювант полиоксидоний
- 4 – отрицательный контроль, нормальная кроличья сыворотка

характеристики антител, красителей и готовых конъюгатов. Конъюгаты имели два выраженных пика поглощения, соответствующих белку и связанному красителю (рисунки 5 и 6). Образование конъюгата белка с флуорохромом подтверждали изменения оптических характеристик, выраженные в смещении максимума поглощения белкового компонента. Пик, характерный для белковых веществ, при конъюгации с ФИТЦ смещался в коротковолновую область, а при конъюгации с Alexa Fluor (532 нм) – в длинноволновую область спектра на 20-30 нм. Значение максимума второго пика поглощения, соответствующего флуоресцентной метке, оставалось на прежнем уровне и для конъюгатов с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм) составило соответственно 495 и 522 нм. Предел чувствительности полученных флуоресцирующих конъюгатов оценивали в сравнении с коммерческим ФИТЦ-конъюгатом антирабического иммуноглобулина (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия). В каждую лунку микропланшета, за исключением зоны отрицательного контроля, вносили равное количество питательной среды, вируссодержащей суспензии и клеточной культуры, после чего планшет инкубировали в течение 3 сут в условиях CO₂-инкубатора (5 % CO₂, 37 °С).

На следующем этапе культуру окрашивали экспериментальными и коммерческим флуоресцирующими конъюгатами в течение 1 ч при 37 °С. Экспериментальные конъюгаты с ФИТЦ готовили в серийных двукратных разведениях от 1:10 до 1:160, конъюгаты с Alexa Fluor (532 нм) – в серийных пятикратных разведениях от 1:10 до 1:1250. Коммерческий

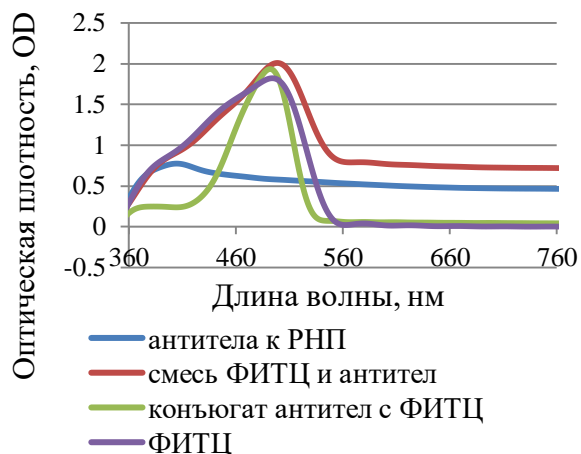


Рисунок 5. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с ФИТЦ

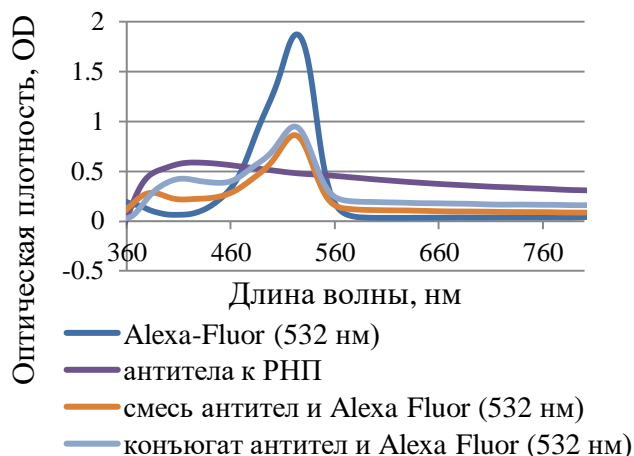


Рисунок 6. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с Alexa Fluor (532 nm)

ФИТЦ-конъюгат готовили в разведении 1:40, рекомендованном инструкцией по применению. При визуальной оценке эффективности применения экспериментального ФИТЦ-конъюгата установлено оптимальное рабочее разведение, соответствующее значению 1:80. Присутствие инфицированных клеток отмечали при их свечении не менее чем на 3 балла, так же как и при окрашивании коммерческим конъюгатом в разведении 1:40 (рисунок 7).

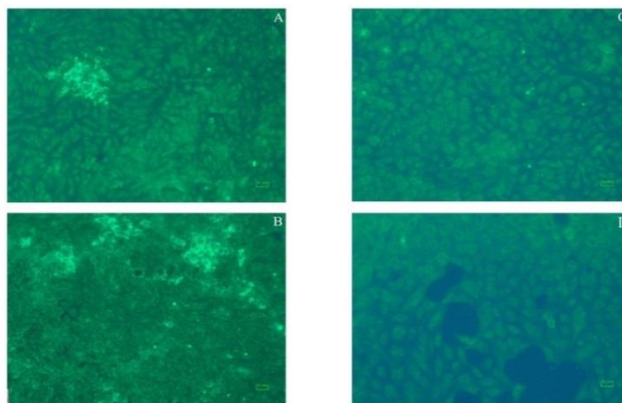


Рисунок 7. Сравнение эффективности коммерческого и экспериментального антирабических ФИТЦ-конъюгатов в образцах клеточной культуры Vero, увеличение (200x)

А – инфицированная *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» клеточная культура Vero, окрашенная коммерческим ФИТЦ-конъюгатом (1:40); В – инфицированная *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» клеточная культура Vero, окрашенная экспериментальным ФИТЦ-конъюгатом (1:80); С – интактная клеточная культура Vero, окрашенная коммерческим ФИТЦ-конъюгатом (1:40); D – интактная клеточная культура Vero, окрашенная экспериментальным ФИТЦ-конъюгатом (1:80)

Увеличение степени разведения раствора конъюгата приводило к менее заметному свечению инфицированных клеток, которое оценивали на 1-2 балла. При визуальной оценке эффективности конъюгата антител с Alexa Fluor (532 нм) специфическое свечение вирусосодержащих образцов с интенсивностью не менее чем на 3 балла отмечено при разведении конъюгата не более чем 1:250 (рисунок 8). Увеличение степени разведения раствора конъюгата приводило к снижению эффективности окрашивания образцов.

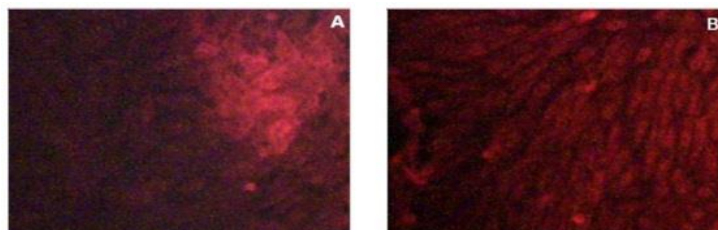


Рисунок 8. Образцы инфицированной *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» клеточной культуры Vero, окрашенные конъюгатом антирабических антител с Alexa Fluor (532 нм), увеличение (100x)

А – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:250);

В – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:1250)

Дальнейшее исследование по разработке метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур проводили с использованием коммерческого и экспериментальных антирабических конъюгатов, взятых в рабочих разведениях. Глава 4 посвящена поиску оптимальных параметров разрабатываемого метода определения вируснейтрализующей активности АИГ в РН ВБ на культуре клеток. Для разработки методического приема определения уровня антител был выбран штамм ВБ «Москва 3253_{Vero}», адаптированный к клеточной культуре. Первая задача данного раздела состояла в изучении особенностей культивирования штамма «Москва 3253_{Vero}» на культурах Vero и ВНК-21 и последующем выборе оптимальной клеточной культуры для постановки разрабатываемого метода *in vitro*.

Схема эксперимента состояла в титровании вирусосодержащей жидкости в 96-луночных микропланшетах в соответствующей питательной среде в последовательных десятикратных разведениях (от 10^{-2} до 10^{-6}). После этого в каждую лунку микропланшетов вносили равный объем культуры клеток Vero или ВНК-21 соответственно в концентрации $(3 \pm 1) \times 10^5$ клеток/мл. Для поддержания жизнедеятельности клеток использовали среду Игла МЕМ с содержанием сыворотки КРС от 2 до 10 %. Затем планшеты с клетками и вирусом выдерживали в CO_2 -инкубаторе (5 % CO_2 при 37 °С) в течение 24, 48 и 72 ч. В указанные сроки исследовали клеточную культуру на ВБ методом иммунофлуоресценции. По завершении инкубации клеточный монослой фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 80 % водным раствором ацетона, предварительно охлажденным до минус 20 °С. Фиксированный монослой окрашивали конъюгатом антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия).

При инкубировании клеточных культур в течение 24 ч обнаруживали слабосветящиеся фокусы специфической флуоресценции, визуально оцениваемые на 1-2 балла в разведениях вируса 10^{-2} ; при инкубировании в течение 48 ч наблюдали фокусы флуоресценции, визуально оцененные на 2-3 балла в разведениях вируса 10^{-2} - 10^{-5} для клеточной культуры Vero и в разведениях вируса 10^{-2} - 10^{-4} для клеточной культуры ВНК-21. В планшетах с 48-часовой культурой ВНК-21 во всех разведениях отмечали частичную деструкцию монослоя, в том числе в образцах с интактными клетками. При инкубировании клеточных культур в течение 72 ч обнаруживаемые фокусы специфической флуоресценции визуально оценивали на 3-4 балла в разведениях вируса 10^{-2} - 10^{-5} для клеточной культуры Vero и в разведениях вируса 10^{-2} - 10^{-4} для клеточной культуры ВНК-21. В планшетах с 72-

часовой культурой ВНК-21 во всех разведениях была отмечена обширная деструкция монослоя, в том числе в образцах с интактными клетками. К 72 ч инкубации в планшетах с культурой Vero появлялись признаки начала деструкции вследствие перерастания клеточного монослоя. Важно отметить, что для клеточных культур ВНК-21, инкубируемых в течение 48 ч и 72 ч, фокусы флуоресценции состояли из малочисленных групп или единичных инфицированных клеток, достаточно удаленных друг от друга, что затрудняло учет результатов. При исследовании инфицированной ВБ клеточной культуры Vero, напротив, выявляли крупные и многочисленные фокусы флуоресценции.

Результаты экспериментов подтвердили возможность использования обеих клеточных культур для детекции вируса с применением люминесцентной микроскопии. Установлена оптимальная концентрация сыворотки КРС в среде для культивирования ВБ – от 2 до 5 %. При добавлении в среду 10 % сыворотки КРС отмечали снижение значения активности ВБ. Оптимальный срок инкубации инфицированной ВБ клеточной культуры соответствовал 48 ч для ВНК-21 и 72 ч для культуры Vero. Анализ особенностей инфицирования ВБ исследуемых клеточных культур позволил обосновать выбор в пользу культуры Vero для применения в РН ВБ *in vitro*. В дальнейших исследованиях по разработке метода контроля уровня антирабических антител *in vitro* применяли клеточную культуру Vero и питательную среду Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки КРС, учет результатов осуществляли через 72 ч от начала инкубации.

На следующем этапе было изучено влияние типа фиксирующего вещества и времени фиксации на структуру инфицированного ВБ клеточного монослоя и значение активности ВБ. Существующие в настоящее время протоколы исследования ВБ в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции предполагают фиксацию клеточных культур охлажденным 80 % водным раствором ацетона с последующим окрашиванием конъюгатом антирабических антител с ФИТЦ в течение 1 ч. Также в литературе встречаются рекомендации по использованию для фиксации клеточных культур раствора формальдегида. При определении антигена ВБ на клеточной культуре важна не только процедура фиксации клеточного монослоя, но и способ дальнейшего окрашивания фиксированных образцов. В данном исследовании для выявления ВБ предлагается использование коммерческого и экспериментальных конъюгатов антител с флуорохромами. В связи с этим в задачи настоящего раздела также входило определение условий, оптимальных для применения экспериментальных диагностических конъюгатов антител к РНП ВБ с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Для фиксации клеточного монослоя использовали 80 % водный раствор ацетона и 4 % раствор формальдегида. Фиксирующие агенты добавляли в лунки планшета с раститрованным ВБ по 50 мкл. Фиксацию проводили при (6 ± 2) и (23 ± 3) °С с интервалами времени 3, 5, 10, 20 и 30 мин. Затем в течение часа осуществляли окрашивание монослоя конъюгатами антител с флуорохромами, взятыми в рабочих разведениях. После окрашивания оценивали титр вируса и состояние монослоя.

При применении 80 % раствора ацетона и 4 % раствора формальдегида были получены сопоставимые результаты. Максимальный титр ВБ наблюдали в образцах, фиксированных формальдегидом или ацетоном в течение 10 мин. При использовании формальдегида отмечали снижение интенсивности флуоресценции в образцах по мере возрастания времени фиксации с 10 до 30 мин. Результаты исследования, полученные при фиксации в температурных условиях (23 ± 3) °С оказались сопоставимы с результатами эксперимента, проведенного при (6 ± 2) °С. В исследовании влияния фиксирующих веществ на интактную клеточную культуру отмечали отсутствие визуально обнаруживаемых нарушений целостности монослоя.

На следующем этапе исследования было обосновано оптимальное время окрашивания образцов экспериментальными конъюгатами антител к РНП ВБ с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Окрашивание проводили в течение 0,5-1,5 ч, качество окрашивания исследовали с интервалом времени 10 мин. Появление фокусов флуоресценции, оцениваемых на 3-4 балла, наблюдали через 40 мин окрашивания любым из исследуемых конъюгатов. В образцах,

окрашиваемых в течение 50-70 мин, фиксировали большее количество фокусов специфической флуоресценции на лунку, чем в образцах, окрашенных в течение 40 мин. Для образцов, окрашиваемых в течение 80-90 мин, вне зависимости от вида используемого конъюгата было отмечено наличие яркого фонового свечения монослоя, препятствующее достоверному определению локализации фокусов флуоресценции. По результатам исследования установлено: оптимальное время фиксации клеточного монослоя 80 % раствором ацетона или 4 % раствором формальдегида – (15±5) мин; оптимальное время окрашивания образцов экспериментальными диагностическими конъюгатами антител к РНП ВБ – (60±10) мин.

Далее проводили определение оптимальной рабочей дозы ВБ «Москва 3253_{Vero}» с целью дальнейшего применения в реакции нейтрализации ВБ *in vitro*. Для исследования были выбраны инфицирующие дозы 50, 100, 300, 500, 1000, 5000 ID₅₀/0,05 мл. Определение рабочей дозы проводили с применением Европейского стандартного образца антирабического иммуноглобулина (Human rabies immunoglobulin BRP batch 1; активность 91 МЕ/мл). Для эксперимента было подготовлено 3 культуральных 96-луночных планшета – по одному на исследование двух вариантов рабочих доз. В лунках планшета готовили трехкратные разведения Европейского стандартного образца АИГ на питательной среде Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки КРС, начиная с разведения 1:50. Каждое разведение исследовали в 8 повторностях. Отрицательный контроль представлял клеточный монослой Vero с нормальной лошадиной сывороткой. Обнаружение ВБ осуществляли методом люминесцентной микроскопии. Расчет титра антител проводили по методу Рида и Менча.

Экспериментально установлено, что при исследовании рабочих разведений ВБ 100, 300, 500, 1000 ID₅₀/0,05 мл титры антител стандартного образца АИГ соответствовали 3,38; 3,23; 2,6; 2,3 lg ED₅₀. При добавлении вируса в дозе 5000 ID₅₀/0,05 мл антитела обнаруживали в титре менее 2 lg ED₅₀, что заметно понижало чувствительность метода. При использовании дозы ВБ 50 ID₅₀/0,05 мл не удалось установить конечную точку титрования стандартного образца АИГ. На основании полученных результатов была установлена оптимальная доза ВБ для определения антирабических антител в РН *in vitro* – 100-300 ID₅₀/0,05 мл.

При определении оптимальной рабочей дозы ВБ «Москва 3253_{Vero}» нейтрализацию вируса осуществляли в течение 1 ч согласно протоколу проведения FAVN-теста. Использование штамма ВБ «Москва 3253_{Vero}» в разрабатываемом методе предполагает необходимость обоснования для данного штамма времени нейтрализации антирабическими антителами. Для установления оптимального значения периода нейтрализации Европейский стандартный образец АИГ титровали в 96-луночных планшетах. Далее в каждую лунку вносили по 50 мкл рабочего разведения ВБ и инкубировали планшеты в СО₂-инкубаторе при 37 °С в течение различных интервалов времени от 10 до 60 мин. По завершении соответствующих периодов нейтрализации добавляли клеточную культуру Vero, инкубировали планшеты в течение 72 ч в СО₂-инкубаторе и исследовали с применением метода люминесцентной микроскопии.

Появление фокусов флуоресценции наблюдали в разведении стандартного образца АИГ 1:375 при нейтрализации в течение 10 мин. С увеличением времени нейтрализации отмечали снижение количества фокусов флуоресценции в лунках с более высоким разведением антител. При нейтрализации вируса в течение 40-60 мин фиксировали стабильные значения титров антирабических антител. Минимальное значение времени нейтрализации, не оказывающее влияние на результат РН *in vitro*, составило 40 мин.

Поскольку ВОЗ рекомендует применение вторичных стандартных образцов для проведения рутинных исследований, при разработке метода определения уровня антирабических антител на клеточной культуре возникла необходимость в получении соответствующего стандартного образца предприятия (СОП). В главе 5 приведено описание результатов исследований, относящихся к разработке и аттестации СОП для контроля АИГ по показателю «специфическая активность» в РН ВБ на культуре клеток, как компонента аналитической системы, а также сравнительный анализ данных по активности АРС и АИГ,

полученных в РН ВБ *in vivo* и разработанным методом *in vitro*. Кандидатом в СОП стал АИГ серии 174, полученный в соответствии с требованиями промышленного регламента на производство АИГ. Аттестацию кандидата проводили в соответствии с нормативными документами Р N 002639/01–250210, разделом «Специфическая активность» и методическими приемами, обоснованными в ходе исследований в рамках главы 4. Значение показателя специфической активности кандидата в стандартные образцы предприятия определяли в РН вируса на клеточной культуре. В качестве образца сравнения использовали АИГ, соответствующий требованиям Европейской Фармакопеи, для применения в исследованиях *in vitro*. Для исследования выбрали три образца кандидата в СОП специфической активности АИГ (таблица 2). Значение специфической активности для кандидата в СОП составило $(180,8 \pm 18,8)$ МЕ/мл. Разработанный СОП специфической активности АИГ для применения в РН ВБ на культуре клеток (сер. 41-01-20) утвержден и внесен в реестр СОП, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Таблица 2 – Определение титра антирабических антител в трех образцах кандидата в стандартные образцы предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина

Образцы кандидата в СОП	Титр активности стандартного образца Европейской фармакопеи	Активность стандартного образца Европейской фармакопеи в МЕ/мл	Титр активности СОП	Титр активности СОП в МЕ/мл	Аттестованное значение СОП в МЕ/мл ($\bar{x} \pm \Delta x$)
Образец 1, опыт 1	1:5841	91	1:14591	227	180,8±18,8
			1:9411	147	
			1:12150	189	
Образец 2, опыт 2	1:1559	91	1:2700	158	
			1:3394	198	
			1:3024	177	
Образец 3, опыт 3	1:2016	91	1:4525	204	
			1:4032	182	
			1:3200	144	
			1:4032	182	

Срок годности разработанного стандарта обоснован результатами исследования его стабильности по показателю «специфическая активность» в долгосрочных испытаниях. При регистрации стандартного образца были представлены данные по сохранению стабильности в течение 1,5 лет. Указанный СОП применяли в качестве образца сравнения при дальнейших исследованиях специфической активности АИГ на клеточной культуре. С учетом установленных в вышеописанных экспериментах оптимальных параметров проводили определение значения специфической активности АРС и АИГ в РН ВБ на клеточной культуре и сравнительный анализ полученных данных с результатами исследования тех же образцов в РН ВБ на белых мышах. При постановке РН *in vivo* в качестве образца сравнения использовали СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в РН на белых мышах с активностью 190 МЕ/мл. Сравнительный анализ полученных результатов показал наличие сильной корреляции ($r > 0,9$) между результатами данных тестов.

Для оценки согласованности данных по активности образцов АИГ и АРС, полученных методами *in vivo* и *in vitro*, применяли метод описательной статистики Блэнда-Алтмана, принятый для сравнения каждой пары показателей, полученных различными способами. Диаграммы Блэнда-Алтмана для сравнения вируснейтрализующей активности АИГ и АРС показаны на рисунках 9 и 10.

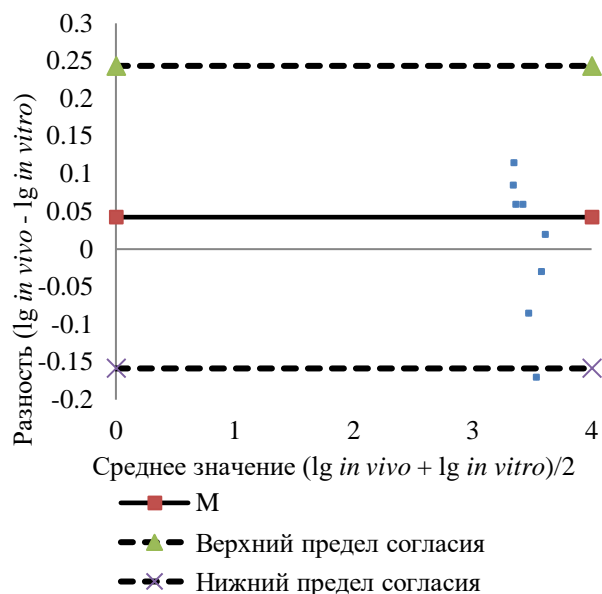


Рисунок 9. Диаграмма Блэнда-Алтмана (образцы антирабического иммуноглобулина)

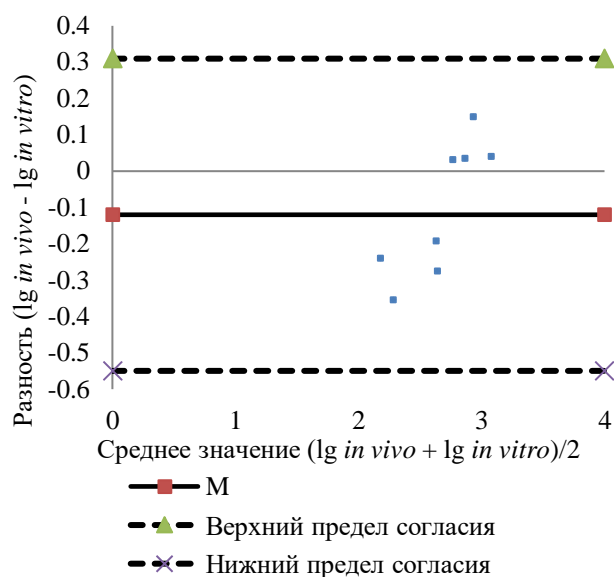


Рисунок 10. Диаграмма Блэнда-Алтмана (образцы антирабических сывороток)

Анализ представленных на рисунках диаграмм показал, что 93,75 % значений разницы показателей при парных измерениях попадают в доверительный интервал ($\pm 1,96 \times SD$), что говорит о тесной линейной связи. При анализе активности АИГ средняя разность между измерениями составила 0,0425, а при анализе АРС – минус 0,12, что свидетельствует об отсутствии систематического расхождения.

Анализ данных позволил сделать вывод о наличии согласованности между значениями специфической активности образцов АИГ и АРС, полученными в результате проведения РН на клеточной культуре Vero и на белых мышах. Полученные в ходе исследований главы 5 данные свидетельствуют о возможности использования разработанного подхода определения уровня антирабических антител в качестве метода контроля специфической активности АРС и АИГ в производстве препарата антирабического иммуноглобулина наравне с методом *in vivo*.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенной работы предложен и экспериментально обоснован комплекс биотехнологических решений по разработке метода определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на клеточной культуре, включающий применение питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина при культивировании инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры, получение флуоресцентного диагностикума, разработку стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток, а также методический прием для определения уровня антирабических антител в иммунных лошадиных сыворотках и препарате иммуноглобулина.

5. ВЫВОДЫ

1. Экспериментально обоснована возможность выделения рибонуклеопротеина из цитоплазмы клеточной культуры Vero, инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}», выращенной на экспериментальной питательной среде, содержащей от 0,1 до 0,25 % сухого ферментативного гидролизата фибрина. Применение экспериментальной среды в указанных концентрациях позволило в $(1,45 \pm 0,05)$ раза увеличить выход рибонуклеопротеина, выделяемого из инфицированной 72-часовой культуры Vero, по сравнению с коммерческими питательными средами 199 и Игла MEM.

2. Разработана эффективная схема иммунизации кроликов для получения антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства, заключающаяся во внутримышечном введении животным на 0, 43 и 57 дни рибонуклеопротеина (400 мкг) с наночастицами коллоидного золота в качестве адьюванта (14-17 нм, 0,14 ммоль). Данная схема позволила получить сыворотки с вдвое большей активностью (1:25600), чем при применении схем иммунизации с использованием полиоксидония в качестве адьюванта и без применения адьюванта.

3. Получены флуоресцирующие конъюгаты на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}». При этом показана возможность эффективного применения полученных экспериментальных конъюгатов антител к рибонуклеопротеину с флуорохромами ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм), взятых в разведениях 1:80 и 1:250 соответственно, наряду с коммерчески доступным ФИТЦ-конъюгатом антирабического иммуноглобулина при исследовании образцов инфицированных вирусом бешенства клеточных культур методом прямой флуоресценции.

4. Разработан методический прием для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток. Особенности предлагаемого метода являются: использование вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», взятого в рабочей дозе от 100 до 300 ID₅₀/0,05 мл, и клеточной культуры Vero; применение в качестве фиксатора 80 % водного раствора ацетона или 4 % раствора формальдегида в течение (15±5) мин; окрашивание образцов коммерческим или экспериментально полученными диагностическими конъюгатами в течение (60±10) мин; период нейтрализации вируса бешенства антирабическими антителами – не менее 40 мин; учет результатов реакции с применением люминесцентной микроскопии через 72 ч от начала инкубации.

5. Разработан и аттестован стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток. Установлена аттестуемая характеристика образца, соответствующая значению (180,8±18,8) МЕ/мл. Экспериментально подтверждена возможность его использования для определения специфической активности иммуноглобулина *in vitro* при проведении контрольных исследований.

6. Установлена сильная корреляция ($r > 0,9$ при уровне значимости $> 95 \%$) и согласованность результатов (93,75 % значений разницы показателей при парных измерениях вошли в доверительный интервал $(\pm 1,96) \times SD$), полученных при определении специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с использованием предлагаемого методического приема и в реакции нейтрализации вируса на белых мышах, применяемой в настоящее время в производстве антирабического иммуноглобулина.

6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные опытные данные будут способствовать внедрению разработанного методического приема в производство иммунобиологического лекарственного средства «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий» для определения его специфической активности *in vitro* при проведении выпускающего контроля качества производителем и подтверждения соответствия требованиям нормативной документации уполномоченными учреждениями Минздрава РФ с целью ввода в гражданский оборот. Разработанный метод может быть применен для оперативного контроля уровня специфических антител в иммунных сыворотках крови лошадей в процессе производственной эксплуатации и индивидуальной оценки напряженности иммунитета каждого производителя.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. *Гаврилова, Ю.К.* Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции / *Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова* // *Биотехнология*. – 2018. – Том 34. – № 4. – С. 83-88. РИНЦ,

ИФ=0,706, Scopus. Количество цитирований: 8. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88>.

2. Генералов, С.В. Биоэтические аспекты совершенствования производства антирабического иммуноглобулина в России / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, **Ю.К. Гаврилова** // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2020. – Том 20. – № 2. – С. 89-96. РИНЦ, ИФ=0,544, CAS. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-89-96>.

3. **Гаврилова, Ю.К.** Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров** // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2021. – Том 21. – № 2. – С. 76-84. РИНЦ, ИФ=0,544, CAS. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84>.

4. Генералов, С.В. Разработка питательной среды на основе гидролизата фибрина для культивирования клеточных культур Vero и ВНК-21 и репродукции вируса бешенства / С.В. Генералов, И.М. Жулидов, М.В. Антонычева, К.И. Холматов, **Ю.К. Гаврилова, Е.Г. Абрамова, А.Д. Белоусов, Е.А. Усачев** // **Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.** – 2018. – Том 14. – № 3. – С. 50-55. РИНЦ, ИФ=0,464.

Патенты:

1. Патент на изобретение № 2673718 Российская Федерация. Питательная среда для культивирования перевиваемых клеточных линий млекопитающих / С.В. Генералов, М.В. Антонычева, Е.Г. Абрамова, К.И. Холматов, И.М. Жулидов, А.Д. Белоусов, **Ю.К. Гаврилова, А.К. Никифоров.** Заявитель и патентообладатель ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Оpubл. 29.11.2018. Бюл. № 34.

Публикации в сборниках научных, научно-практических конференций и иных изданиях:

1. **Гаврилова, Ю.К.** Способ определения вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток Vero / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.В. Кочкин, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, А.К. Никифоров** // Материалы III Всероссийского семинара памяти профессора Ю.П. Волкова «Современные проблемы биофизики, генетики, электроники и приборостроения». – 5-7 июня 2017. – г. Саратов, – С. 20-21.

2. Генералов, С.В. Разработка и перспективы использования методов *in vitro* в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, **Ю.К. Гаврилова, Л.В. Савицкая, М.Н. Киреев, И.М. Жулидов, М.В. Галкина, А.В. Кочкин, А.К. Никифоров** // Материалы международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, химии». – 13-15 июня 2017. – г. Саратов, – С. 143-145.

3. **Гаврилова, Ю.К.** Метод иммунофлуоресценции с использованием клеточных культур для определения активности вируса бешенства штамма «Москва 3253» / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.В. Кочкин, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, А.К. Никифоров** // Материалы международной научно-практической конференции «Инновации в пищевой технологии, биотехнологии, химии». – 13-15 июня 2017. – г. Саратов, – С. 140-142.

4. **Гаврилова, Ю.К.** Применение методов *in vitro* для контроля стадий производства антирабического иммуноглобулина / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.В. Кочкин, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая** // Материалы 22-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – 23-27 апреля 2018. – г. Пушкино, – С. 70-71.

5. **Гаврилова, Ю.К.** Получение антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства и оценка возможности их применения / **Ю.К. Гаврилова, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова** // Материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены». – 24-26 октября 2018. – г. Москва, – С. 147-148.

6. **Гаврилова, Ю.К.** Успехи и проблемы практической реализации комплекса мер профилактики бешенства на территории Российской Федерации / **Ю.К. Гаврилова**, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, А.В. Кочкин, М.В. Галкина, Л.В. Савицкая, И.М. Жулидов, Р.А. Свинцов, А.Г. Селезнева // *Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ»*. – 20-21 ноября 2018. – г. Саратов, – С. 89-91.

7. **Гаврилова, Ю.К.** Разработка схемы получения антител к рибонуклеопротеину аттенуированного вируса бешенства / **Ю.К. Гаврилова**, С.В. Генералов, М.Н. Киреев, Н.А. Шарапова, Е.Г. Абрамова, Л.В. Савицкая, М.В. Овчинникова, Т.Ю. Кириллова, А.П. Семакова // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2019. – № 5. – С. 3-8. РИНЦ, ИФ=0,512. Количество цитирований: 2. [https://doi.org/ 10.36233/0372-9311-2019-5-3-8](https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-5-3-8).

8. Генералов, С.В. Современные биотехнологии производства иммунобиологического препарат для постэкспозиционной профилактики бешенства – антирабического иммуноглобулина / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, **Ю.К. Гаврилова**, И.М. Жулидов, А.К. Никифоров // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения»*. – 11-12 сентября 2019. – г. Нижний Новгород, – С. 305-308.

9. **Гаврилова, Ю.К.** Разработка стандартного образца предприятия для определения специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина на культуре клеток / **Ю.К. Гаврилова**, С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, О.А. Лобовикова // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию академика И.Н. Блохиной «Эпидемиологический надзор за актуальными инфекциями: новые угрозы и вызовы»*. – 26-27 апреля 2021. – г. Нижний Новгород, – С. 398-400.

10. **Гаврилова, Ю.К.** Получение флуоресцирующих конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства и оценка их свойств / **Ю.К. Гаврилова**, С.В. Генералов, Т.Ю. Кириллова, М.Н. Киреев, А.Н. Спицын // *Национальные приоритеты России*. – 2021. – Том 42. – № 3. – С. 133-136. РИНЦ, ИФ=0,201.

11. Генералов, С.В. Экспериментальное обоснование времени взаимодействия аттенуированного вируса бешенства со специфическими антителами в условиях *in vitro* / С.В. Генералов, **Ю.К. Гаврилова**, А.В. Кочкин, В.Н. Панова, Е.Г. Абрамова // *Материалы XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней»*. – 5-6 октября 2021. – г. Иркутск. – С. 80-81.

ОСНОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АИГ	антирабический иммуноглобулин
АРС	антирабическая сыворотка
ВБ	вирус бешенства
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ДИА	дот-иммуноанализ
ИФА	иммуноферментный анализ
кДа	килодальтон
КРС	крупный рогатый скот
МЕ	международная единица

ОФС	общая фармакопейная статья
ПААГ-ДСН	полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия
РН	реакция нейтрализации
РФ	Российская Федерация
СОП	стандартный образец предприятия
ФИТЦ	флуоресцеин-5-изотиоцианат
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»
ФГБУ «ВНИИЗЖ»	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Владимирский научно-исследовательский институт здоровья животных»
ФГФ	ферментативный гидролизат фибрина
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»	Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ВНК-21	перевиваемая культура клеток почек сирийского хомячка
CVS	штамм вируса бешенства «Challenge virus standard»
ED ₅₀ /мл	эффективная доза антител, способная обеспечить защиту клеточного монослоя от воздействия вируса бешенства в 50 % лунок микропланшета
FAVN-test	fluorescent antibody virus neutralization test флуоресцентный вируснейтрализующий тест
ID ₅₀ /0,05 мл	инфицирующая доза, способная вызвать образование специфических фокусов флуоресценции в 50 % лунок микропланшета
LD ₅₀ /мл	летальная доза для 50 % взятых в опыт животных
r	коэффициент корреляции Пирсона
RFFIT	rapid fluorescent foci inhibition test тест ингибиции фокусов флуоресценции
SD	стандартное отклонение
Vero	клетки почки африканской зеленой мартышки
<i>virus fixe</i>	фиксированный вирус бешенства