

**Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ»**

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

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Генералов Сергей Вячеславович

Саратов – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Вирус бешенства и его антигенный состав	18
1.2 Методы выявления вируса бешенства и антител к нему и их актуальность для производства антирабических препаратов	26
1.3 Стандартные образцы и их применение в производстве антирабического иммуноглобулина.....	40
Заключение по обзору литературы	43
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	45
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1 Материалы	45
2.1.1 Штаммы вируса бешенства.....	45
2.1.2 Сыворотки и препараты	46
2.1.3 Вирусные антигены	47
2.1.4 Клеточные культуры.....	47
2.1.5 Экспериментальные животные.....	47
2.1.6 Реактивы, растворы и питательные среды	48
2.1.7 Оборудование и приборы.....	50
2.2 Методы.....	52
2.2.1 Биотехнологические методы	52
2.2.2 Вирусологические методы	53
2.2.3 Биологические методы	53
2.2.4 Биохимические, биофизические, физико-химические и иммунохимические методы	54

2.2.5 Статистические методы обработки результатов исследований.... 57

ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНУ
ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253_{Vero}» И
КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ
КОНЬЮГАТОВ 59

3.1 Выделение и физико-химические характеристики
рибонуклеопротеина вируса бешенства штамма «Москва 3253_{Vero}»..... 59

3.2 Экспериментальное обоснование применения питательной среды на
основе ферментативного гидролизата фибрина при культивировании
инфицированных вирусом бешенства клеток 61

3.3 Выбор схемы иммунизации продуцентов для получения сывороток к
рибонуклеопротеину вируса бешенства 66

3.4 Выделение антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства и
получение флуоресцирующих конъюгатов 69

Заключение по главе 3 73

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ
ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА И АНТИРАБИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛ НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МЕТОДОМ
ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ 75

4.1 Экспериментальное обоснование возможности применения клеточных
культур Vero и ВНК-21 для выявления вируса бешенства 75

4.2 Определение условий фиксации инфицированной вирусом бешенства
клеточной культуры и окрашивания флуорохромными конъюгатами 78

4.3 Определение оптимальной рабочей дозы вируса для постановки
реакции нейтрализации *in vitro* 82

4.4 Определение оптимального периода нейтрализации вируса бешенства
на клеточной культуре 83

Заключение по главе 4	84
ГЛАВА 5 ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА	85
5.1 Разработка и аттестация стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в тесте <i>in vitro</i>	85
5.2 Сравнительный анализ результатов исследования специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методами <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	88
Заключение по главе 5	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	101
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Бешенство представляет собой 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 [51,66,165].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире от данного заболевания погибает около 60 тыс. человек [222]. Несмотря на общую тенденцию снижения случаев бешенства у людей, в Российской Федерации (РФ) сохраняется напряженная эпидемиологическая и эпизоотологическая обстановка [65]. Принятие своевременных мер постэкспозиционной профилактики на сегодняшний день является эффективным путем минимизации случаев гибели людей от данного заболевания, характеризующегося 100 % летальностью. По данным Роспотребнадзора, ежегодно в лечебные учреждения России по причине укусов и других повреждений, полученных в результате контакта с животными, обращается около 450 тыс. человек и более половины из них по решению медицинских работников впоследствии получает антирабическое лечение [60,66]. В случае многочисленных или глубоких повреждений, а также повреждений опасной локализации, полученных при контакте с животными, перед началом курса антирабической вакцинации пациентам назначают введение препарата антирабического иммуноглобулина (АИГ). На территории России с 2004 года на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» осуществляют выпуск «Имуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади, жидкого, раствора для инъекций», включенного в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения. В настоящее время на территории России ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» является единственным производителем антирабического иммуноглобулина.

Индикатором протективных свойств АИГ является специфическая активность. Определение значения специфической активности при производстве АИГ осуществляют в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства (ВБ) на белых мышах (*in vivo*) [94]. Данный метод характеризуется высокой чувствительностью, трудоемок, длителен (срок наблюдения за подопытными животными – 14 сут), предполагает использование большого количества стандартных лабораторных животных и наличие специализированных помещений для содержания инфицированных животных.

Данные обстоятельства указывают на необходимость поиска альтернативных способов определения содержания антирабических антител в препарате АИГ. Более того, отказ от использования животных и переход на методы *in vitro* при определении показателей качества являются основными факторами гармонизации российских и международных фармакопейных документов [59]. Актуальность разработки и применения методов *in vitro* для определения антирабических антител при производстве препарата АИГ также обоснована рекомендациями экспертов ВОЗ по бешенству [221,222].

В настоящее время к практическому применению предложены различные способы исследования антирабических антител *in vitro*. Известны методы, основанные на иммуоферментном анализе [33,88,225], а также их разновидности, подразумевающие использование в качестве метки золь коллоидных металлов [73,144].

По мнению ВОЗ среди существующих в настоящее время методов *in vitro* альтернативой классическому тесту *in vivo* – РН вируса на белых мышах, являются методы, основанные на обнаружении вируса бешенства в культуре клеток с использованием флуоресцирующих конъюгатов: RFFIT (rapid fluorescent foci inhibition test) и FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralization test) [173,191]. Оба теста дают эквивалентные результаты, имеют схожий принцип, но несколько отличаются в методологическом отношении [47]. Помимо указанных методов, описание которых приведено в официальных руководствах ВОЗ и Меж-

дународного эпизоотического бюро [220], а также в Европейской фармакопее [150], в российской и зарубежной литературе описаны модифицированные варианты RFFIT и FAVN-теста, отличающиеся схемой постановки анализа, используемыми клеточными культурами и штаммами вируса. Предлагаемые модификации позволяют улучшить метрологические характеристики указанных методов за счет использования пероксидазных конъюгатов моноклональных антител [147], устранения цитотоксического эффекта в случае исследования образцов ненадлежащего качества [106], предварительной обработки клеточной культуры DEAE-декстраном, способствующей эффективному связыванию вируса с клеткой [213]. Использование других клеточных культур и штаммов вируса бешенства позволило расширить применение аналогичных методических приемов в сфере диагностики бешенства и производства антирабических вакцин [8,13,95], повысить биологическую безопасность в результате применения непатогенных штаммов вируса бешенства или близкородственных вирусов [176,180].

Другим аспектом разработки метода иммунофлуоресценции с применением культур клеток является усовершенствование процедуры окрашивания инфицированных клеточных культур флуоресцирующими конъюгатами. Известны исследования, предполагающие исключение этапа окрашивания за счет использования штаммов, способных к продукции флуоресцирующего белка, что позволяет сократить время анализа [186]. Тем не менее, для практической деятельности актуальным является разработка и применение флуоресцирующих конъюгатов, отличающихся специфичностью связывания и высокой флостабильностью. В настоящее время в России и за рубежом производят диагностические конъюгаты антирабических антител с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), которые успешно применяют для обнаружения вируса бешенства и определения содержания антител в сыворотках крови животных [95]. При разработке конъюгатов возможно использование как моноклональных, так и поликлональных антител к генетически стабильным субъединицам вируса бешенства – нуклеопротеину [23,115,202] и фосфопротеину [214], а также флуорохромных

красителей с высокой фотостабильностью [23,214]. Использование нуклеопротеина, очищенного или представленного комплексом с рибонуклеиновой кислотой (РНК), является перспективным при разработке высокочувствительных диагностикумов для обнаружения вируса бешенства благодаря стабильности его аминокислотной последовательности по сравнению с другими белками ВБ [23,115]. При этом следует отметить, что получение подобных продуктов требует проведения научных исследований по совершенствованию методов культивирования, разработки питательных сред для выращивания вируса и клеточных культур, иммунизации животных, выделению и очистке антигенов и антител [23,202].

В настоящей работе в качестве контрольного штамма предлагается использование фиксированного штамма вируса бешенства, полученного в результате адаптации производственного штамма «Москва 3253» к клеточной культуре Vero [3]. Этот штамм имеет существенные отличия в геноме по сравнению с исходным штаммом [43], что позволяет обосновать указанный выбор.

Необходимым элементом аналитической системы помимо метода контроля является стандартный образец [15]. При разработке методов допускается использование первичных стандартных образцов, таких как международные стандарты ВОЗ, однако данные образцы, прежде всего, являются эталоном для сравнения. Для многократного применения в рутинных исследованиях более рационально использование вторичных стандартных образцов, разработка которых является важной задачей, требующей решения [212].

Цель и задачи.

Целью работы явилась разработка метода *in vitro* с использованием клеточных культур, перспективного для контрольных исследований специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

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 (АРС) 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 (ФГФ), 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 АИГ 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 АИГ – 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 АИГ. 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» (от 01.12.2020).

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 крови лошадей-продуцентов, препарат антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия), 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.

В работе применяли следующие методы исследования:

биотехнологические – культивирование перевиваемых клеточных культур [92], культивирование вируса бешенства *in vitro* [173,191];

вирусологические – вычисление LD₅₀, определение титра вируса бешенства и показателя специфической активности АИГ [173];

биологические – иммунизация животных, забор крови методом тотального обескровливания [21,40];

биохимические, биофизические, физико-химические и иммунохимические методы – выделение рибонуклеопротеина вируса бешенства [126]; получение сухого ферментативного гидролизата фибрина [35]; определение концентрации водородных ионов в растворе [67]; электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [71]; определение содержания белка [68]; выделение сыворотки крови [9]; дот-иммуноанализ (ДИА) [90]; иммуноферментный анализ (ИФА) [90]; осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония [93]; конъюгирование антител с флуоресцирующими метками [173]; конъюгирование антител с Alexa Fluor (532 нм) согласно методике фирмы-изготовителя флуорохрома; люминесцентная микроскопия;

статистические – расчет титра антител и инфицирующих доз (lg LD₅₀ и lg ID₅₀) ВБ выполняли по методу Рида и Менча [173]; статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами [70]; сравнение результатов исследования активности в тестах *in vitro* и *in vivo* методом Блэнда-Алтмана [109] и методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона [6,45]. Вычисления осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel 2010 и «Программы для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия, свидетельство о государственной регистрации № 2016617051).

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_{Vero}», конъюгированные с флуорохромными красителями флюоресцеинизотиоцианатом 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 Vero, вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» 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.

Достоверность работы 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 Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); 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 и 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирус бешенства и его антигенный состав

Бешенство представляет собой остропротекающее заболевание, вызываемое патогеном вирусной природы, с характерным поражением центральной нервной системы. При условии отсутствия своевременных мер специфической профилактики, в 100 % случаев заболевание приводит к летальному исходу. Данному заболеванию подвержены все виды теплокровных животных, а также человек. Основной причиной заболевания людей бешенством являются укусы больных бешенством уличных собак [173,221,222].

По оценке ВОЗ, Российская Федерация относится к группе стран со средним уровнем риска заражения человека [75]. По данным Роспотребнадзора в России в период с 2012 по 2018 гг. ежегодно регистрировали от 370 до 409 тыс. случаев обращения населения в учреждения здравоохранения по причине укусов и других повреждений, полученных в результате контакта с животными. По результатам наблюдений за многолетний период в России ежегодно регистрировали около 12 случаев бешенства у людей [75]. Тем не менее, в последние годы наблюдается тенденция к снижению числа летальных исходов, вызванных вирусом бешенства [65]. Плановая вакцинация сельскохозяйственных, домашних и диких животных антирабическими вакцинами позволяет предупреждать распространение инфекции среди животных, а наличие в учреждениях здравоохранения препаратов для профилактики бешенства у людей – антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина, дает возможность оказывать своевременную медицинскую помощь, тем самым предупреждая неблагоприятный исход болезни. В зависимости от степени тяжести и места локализации повреждений, полученных при контакте с потенциально больным животным, применяют единую тактику оказания антирабической помощи – обработку раны с последующей вакцинацией или комбинированным лечением. По-

следнее подразумевает введение антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины по классической схеме [194].

Классификация. Возбудителем бешенства у человека и всех теплокровных животных является нейротропный вирус, относящийся к роду *Lyssavirus*, семейству *Rhabdoviridae*, порядку *Mononegavirales* согласно классификации, предложенной Международным Комитетом по таксономии вирусов. Семейство *Rhabdoviridae* состоит из 13 родов: *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus*, *Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivivirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus*, *Varicosavirus*, *Vesiculovirus*. Род *Lyssavirus* включает в себя 17 генотипов вируса бешенства, которые разделяют на четыре филогенетические группы. К первой группе относят – RABV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, BBLV, ARAV, KHUV, IRKV; ко второй – LBV, MOKV, SHIBV. К третьей филогруппе относят генотип WCBV, к четвертой – IKOV [57]. На территории России фиксируют циркуляцию представителей многих генотипов ВБ, однако наибольшее количество выделенных полевых изолятов принадлежит к генотипу RABV [36,56,74,98,100]. Генотипы KBLV, TWBLV и GBLV, по данным исследований, имеют наибольшее сходство с представителями первой филогруппы [141,149,182]. Доказано существование перекрестной антигенной связи на уровне протеина N внутри рода *Lyssavirus*, за исключением вида *West Caucasian bat virus* (WCBV) [101].

Морфология вируса бешенства. Частицы вируса бешенства обладают пуле- или конусоподобной формой, на их поверхности расположены характерные выступы (шипы) длиной 5-10 нм. Длина частиц колеблется от 100 до 430 нм, диаметр составляет около 75 нм [24]. Молекулярная масса вириона варьирует в пределах 300-1000 МДа [10]. Вирион рабдовирусов представлен несегментированной односпиральной линейной молекулой РНК негативной полярности длиной около 12000 нуклеотидов и 5 структурными белками: N (нуклеопротеин; 47-62 кДа), Р (фосфопротеин; 35-50 кДа), М (матриксный протеин; 20-30 кДа), G (гликопротеин; 65-90 кДа), L (РНК-зависимая РНК-

полимераза; 150-190 кДа) [223]. РНК вируса не обладает инфекционностью [165,206]. Белки N, L и P формируют нуклеокапсид, а белки G и M включены в состав липопротеидной оболочки. Структура генома вируса бешенства представлена следующим образом: 3'-N-P-M-G-L-5'. РНК вируса бешенства, локализованная на 3'-конце генома, отвечает за процессы транскрипции и трансляции с последующим формированием белков вируса.

Структура и функции протеинов вируса бешенства. Нуклеопротеин вируса бешенства (белок N) включает 450 аминокислотных остатков (а.о.), в сравнении с другими белками наименее подвержен изменениям по аминокислотному составу, вследствие чего признан определяющим показателем при осуществлении филогенетического анализа [49]. Белок N является основным внутренним белком вируса, совместно с вирусной РНК формирует комплекс – рибонуклеопротеин (РНП), отвечающий за транскрипцию и репликацию вирусного генома, обладает специфическими антигенными детерминантами, свойственными всем вирусам бешенства и некоторым родственным вирусам, защищает РНК от рибонуклеаз во время морфогенеза, играет важную роль в формировании клеточного иммунитета, активизируя выработку комплементсвязывающих и преципитирующих антител. Экспериментально установлена роль РНП в образовании протективного иммунного ответа [129]. Вследствие высокой стабильности аминокислотной последовательности белка N, рибонуклеопротеин представляет интерес для исследователей при получении высокочувствительных диагностических конъюгатов для детекции ВБ [23,115].

Матриксный белок (белок M) – структурный нефосфорилированный белок, содержащий 202 а.о. Обеспечивает взаимосвязь между нуклеокапсидом и G-белком во время сборки вириона, стягивает звенья рибонуклеопротеина в цилиндр со спиральной симметрией.

Фосфопротеин (белок P) – фосфорилированный полипептид, содержит 297 аминокислот, является некаталитическим кофактором в транскрипции и

репликации вирусного генома. Белок представлен в двух различающихся по степени фосфорилирования формах – М1 и М2.

РНК-зависимая РНК-полимераза (L-белок) – полипептид, содержащий 2142 а.о., участвующий в инициации первичной транскрипции геномной РНК после выхода РНП в цитоплазму зараженной клетки.

Гликопротеин (G-белок) – полипептид, содержащий 505 а.о., выполняет главную роль в развитии инфекционного процесса и индукции факторов противовирусного иммунитета, на поверхности вириона представлен в виде выступающих шипов [223]. Гликопротеин участвует в формировании иммунитета против бешенства в организме животных и человека, является мишенью для Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток [137,138]. Более того, специфические вируснейтрализующие антитела (ВНА) в организме формируются, как правило, к G-белку [128].

Патогенез. Инфицирование человека вирусом бешенства чаще всего происходит в результате укусов, полученных при контакте с больным бешенством животным, ослюнения поврежденных кожных покровов или попадания вируса на неповрежденные слизистые оболочки [25,81, 116,124,132]. Доказана возможность заражения бешенством аэрогенным [122,123,139], алиментарным [107,133,188], трансплацентарным путем [121,148,171,204], а также при трансплантации органов и прочих медицинских манипуляциях [113,117,207,216].

Непродолжительное время (до 2 недель) без заметных внешних проявлений вирус сохраняется в воротах инфекции, после чего начинается постепенное центростремительное распространение инфекции. По достижении и поражении вирусом спинного и головного мозга, по центробежным нервам вирус распространяется по всему организму, вызывая характерные проявления симптомов болезни.

Жизненный цикл. Адсорбция вирусной частицы на поверхности клетки происходит за счет взаимодействия рецепторов, локализованных на поверхностях вируса и клетки-мишени. Инициация развития инфекционного процесса возможна за счет вандерваальсовых взаимодействий, осуществляемых между

гликопротеином ВВ и чувствительными клеточными рецепторами. Адсорбированная путем пиноцитоза на поверхности клетки-мишени вирусная частица проникает в цитоплазму клетки, где агрегируется с другими вирусными частицами в крупные эндосомы. Впоследствии происходит слияние вирусной оболочки с мембранами эндосомы и диссоциация белково-липидной оболочки вируса, в результате чего происходит выход РНП в цитоплазму инфицированной клетки [210]. Применение антител к РНП ВВ, присутствующему в цитоплазме инфицированной клеточной культуры до начала образования цельного вируса, при разработке диагностикумов позволяет обеспечить высокую чувствительность анализа [23,115]. После выхода РНП в цитоплазму протеазы вириона гидролизуют белки, входящие в состав оболочки, с образованием аминокислот, предназначенных для синтеза будущих вирусных частиц. В это же время, в инфицированной клетке постепенно снижается скорость процессов, направленных на обеспечение ее жизнедеятельности.

Структурные гены, синтезирующие белки N, P, M, G и L геномной РНК, расположенной в нуклеокапсиде, транскрибируются в пять положительных цепей моноцистронных матричных РНК и полноразмерную положительную цепь репликативной промежуточной РНК, которая служит матрицей для репликации отрицательной РНК генома будущих вирусных частиц [134,145]. Структурные белки N, P, M, и L синтезируются на свободных рибосомах в цитоплазме, а белок G синтезируется на мембраносвязанных рибосомах. Некоторые из молекулярных комплексов нуклео- и фосфопротеина продуцируют цитоплазматические тельца включения (тельца Бабеша-Негри), а некоторые комплексы N-P инкапсидируют вирусные РНК с положительной и отрицательной цепью. После того, как отрицательная РНК генома потомства инкапсулируется белковым комплексом N-P, белок L включается в данный комплекс с образованием рибонуклеопротеина дочерних (как полноразмерных стандартных, так и более коротких дефектных) структур, белок M связывается с молекулами рибонуклеопротеина и преобразует их в каркасные структуры. Последние взаимодействуют с тримерными G-структурами,

расположенными на плазматической мембране, и собираются в вирионы, которые отпочковываются от плазматической мембраны инфицированной клетки в прилегающее внеклеточное или внутриклеточное пространство [103,135,152,163,172].

Применение штаммов ВБ в производстве антирабических препаратов.

В производстве антирабических лекарственных средств применяют аттенуированные (фиксированные) штаммы вируса бешенства, обладающие определенными биологическими свойствами и соответствующие ряду требований ВОЗ.

Штамм ВБ, предназначенный для производства антирабических лекарственных средств, должен обладать высокой активностью по отношению к виду животного или клеточной культуры, используемых для его воспроизводства, пониженной способностью к образованию телец Бабеша-Негри, высокой тропностью к тканям центральной нервной системы и низкой тропностью к внутренним органам. Для бешенства, вызванного фиксированным штаммом ВБ, характерен короткий инкубационный период (4-5 сут) и паралитическая форма течения болезни без явлений возбуждения [81].

Большинство штаммов ВБ, применяемых в настоящее время в производстве, берут начало от штамма, полученного Луи Пастером путем многократных интрацеребральных пассажей на кроликах. К наиболее часто используемым в производстве антирабических препаратов штаммам вируса бешенства относят PAS (Louis Pasteur virus), PV (Pasteur virus), PM (Pitman-Moore), CVS (Challenge Virus Standard), Flury low egg passage, Flury high egg passage, ERA (Evelyn Rokitniki Abelseth), SAD (Street Alabama Dufferin), FWR (The French wild rabies isolates from foxes), Kelev, Nishigara strain, Fuenzalina strain (S-51 и S-91), МОК (Mokola virus) [173]. Штамм фиксированного ВБ «Внуково-32», используемый в производстве очищенной инактивированной концентрированной культуральной антирабической вакцины для людей (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН», Россия; КОКАВ Микроген (Иммунопрепарат), Россия), и фиксированный ВБ «Москва 3253», применяемый в производстве препарата

гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия), являются производными от штаммов SAD и PV соответственно и по своим биологическим свойствам полностью отвечают требованиям ВОЗ к производственным штаммам [91,173]. Для контроля специфической активности антирабического иммуноглобулина и иммуногенности вакцин используют производные штамма CVS.

Поддержание фиксированных штаммов ВБ успешно осуществляют на восприимчивых лабораторных животных (кроликах, белых мышах) и клеточных культурах. Среди клеточных культур для производства и контроля антирабических препаратов в настоящее время применяют Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) [105,142,153,185,187], ВНК-21 (перевиваемые клетки почки сирийского хомячка) [106,151], клетки почки свиньи и собаки [184], диплоидные клетки человека [114,209], куриные фибробласты [63,166,168], первичные клетки почки сирийского хомячка [81,85]. Для культивирования клеточных линий и вирусов применяют питательные среды с определенным химическим составом с добавлением сыворотки крупного рогатого скота или без нее. К наиболее часто применяемым питательным средам относится среда Игла MEM, 199, среда Хэма, среда Мак-Коя, среда Лейбовица и другие [92]. Их применение при проведении крупномасштабных исследований на клеточных культурах может оказаться дорогостоящим. Снизить стоимость исследований на модели клеточных культур возможно за счет применения гидролизатов белков растительного или животного происхождения в качестве основы для приготовления питательной среды [44,50]. В их состав входят низкомолекулярные пептиды, микроэлементы и прочие биологически активные соединения, способные обеспечить благоприятные условия для клеточного роста [89].

В настоящее время сохраняется тенденция применения белковых гидролизатов в области разработки и использования питательных сред для получения субстанций, с высоким содержанием частиц вируса бешенства либо его антигенов. В ряде случаев применение питательных сред на основе белковых

гидролизатов имеет преимущество в сравнении с использованием традиционных коммерческих сред. Известен опыт практического применения среды на основе гидролизата лактальбумина для репродукции ВБ в клетках сирийских хомячков [7,61]. Использование среды на основе мышечного гидролизата позволило оптимизировать суспензионное культивирование клеточной культуры ВНК-21/13-02, зараженной вирусом бешенства (штамм «Щелково-51»), что дало возможность стабилизировать нативную структуру вирусных антигенов и, как следствие, повысить иммуногенность вакцины [78]. Аналогичный подход к замене коммерческой среды на среду, приготовленную на основе мышечного гидролизата, привел к снижению ее потребления в процессе производства антирабической вакцины на основе штамма РБ-71 («БелНИИВГНКИ») [32]. Сочетание гидролизатов белков мышц и лактальбумина с добавлением аминокислот позволило получить питательную среду, близкую по составу к коммерческой среде RPMI-1640, применяемой для производства вакцин против различных вирусов, в том числе вируса бешенства [29,30]. В отношении культивирования ВБ на клетках Vero показан положительный эффект от применения питательных сред на основе гидролизата казеина и гемогидролизата [86].

Применение клеточных культур для репродукции вируса привело к развитию технологии производства антирабических препаратов, вакцин и иммуноглобулинов, и повышению их качества. Клеточные культуры нашли применение и для совершенствования технологии получения антирабических сывороточных препаратов [164]. Другими аспектами их улучшения являются использование современных систем очистки [1], получение рекомбинантных препаратов, в том числе и на основе F(ab)₂-фрагментов, наноантител и моноклональных антител [135]. Следует отметить, что модификация отдельных этапов технологической схемы производства требует применения высокочувствительных и специфичных методов исследования *in vivo* и *in vitro* для осуществления надлежащего контроля соответствия спецификационных показателей заданным значе-

ниям. Одним из показателей качества антирабического иммуноглобулина является его специфическая активность, которая отражает способность препарата нейтрализовать вирус бешенства и обеспечить защиту пациента до появления собственных нейтрализующих антител. В настоящее время ВОЗ рекомендует определение уровня нейтрализующих антител осуществлять методами *in vitro*, в том числе и с использованием клеточных культур [220]. Анализ существующих актуальных методов *in vitro* для исследования вируса бешенства и антирабических антител рассмотрен в следующей части данной главы.

1.2 Методы выявления вируса бешенства и антител к нему и их актуальность для производства антирабических препаратов

Существующий в настоящее время спектр методов исследования материала на наличие ВБ и антител к нему позволяет с той или иной степенью успешности решать задачи по их детекции и количественному учету. Оценка методов исследования по параметрам чувствительности и специфичности дает возможность сделать выводы относительно эффективности применения методов в рамках конкретных задач.

Методы исследования, используемые в вышеуказанных сферах, формируют группы в зависимости от объекта, детектируемого в материале: 1) методы обнаружения вируса бешенства и его отдельных белков; 2) методы выделения живого ВБ; 3) методы детекции антирабических антител; 4) методы детекции нуклеиновых кислот ВБ. Первая группа методов представлена гистологическим методом, электронной и атомно-силовой микроскопией, методом флуоресцирующих антител, иммуноферментным анализом (ИФА), проточной цитометрией, иммуноэлектрофорезом, методом обнаружения ВБ по цитопатическому действию, методом образования бляшек, реакцией гемагглютинации (РГА, РНГА), реакцией диффузной преципитации (РДП), реакцией связывания комплемента (РСК), иммуногистохимическими и иммунохроматографическими тестами. Вторую группу составляют методы выделения ВБ на мышах (*in vivo*) и на клеточной

культуре (*in vitro*). В третью группу входят методы RFFIT, FAVN-test, проточная цитометрия и реакция нейтрализации вируса на белых мышах. Последняя группа представлена высокочувствительными молекулярно-генетическими методами исследования.

Гистологические исследования. Исследование на вирус бешенства методом световой микроскопии представляет собой выявление в окрашенных мазках-отпечатках мозговой ткани характерных специфических включений – телец Бабеша-Негри. Наличие в опытных образцах четко очерченных овальных или продолговатых гранулированных включений, приобретающих розово-красный цвет при окрашивании красителем Селлера, считают абсолютным диагностическим признаком заболевания, вызываемого ВБ [159]. Существенным недостатком метода является низкая диагностическая чувствительность, тельца Бабеша-Негри, как правило, обнаруживают в образцах от больных на терминальной стадии заболевания. Вероятность выявления телец Бабеша-Негри связывают и с особенностями штаммов ВБ, в частности, большинство фиксированных штаммов ВБ не образуют телец Бабеша-Негри в мозговой ткани. Данное обстоятельство ограничивает применение гистологических исследований в производстве антирабических препаратов [81].

К разновидностям гистологического метода исследования материала на ВБ относят **иммуногистохимический экспресс-тест**, разработанный центром по контролю заболеваемости в США [181]. Метод основан на детекции нуклеопротеина ВБ в материале с помощью диагностикума на основе концентрата моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ, конъюгированных со стрептавидин пероксидазой и красителем. Результаты анализа, проведенного при помощи данного теста, учитывают методом световой микроскопии. Такие преимущества, как небольшое время для проведения анализа (не более часа), экономичность, отсутствие необходимости в наличии сложного дорогостоящего оборудования, возможность исследования образцов, хранившихся в глицерине в течение 15 месяцев или в замороженном состоянии не более 2 лет, позволяют

использовать метод в полевых условиях. Данные исследований свидетельствуют о высокой степени чувствительности и специфичности иммуногистохимического теста в сравнении с методом флуоресцирующих антител [130,161,169]. Главным и весьма существенным недостатком теста является ограниченность выпуска наборов реагентов, используемых его для постановки и одобренных ВОЗ. В настоящее время заказ диагностических наборов возможен исключительно через сотрудничество с Центрами по контролю и профилактике заболеваний США [170].

Метод флуоресцирующих антител (МФА, FAT – fluorescent antibody test) представляет собой выявление вируса бешенства в материале при помощи меченных флуоресцентными красителями антител к цельному вирусу или его белкам. Образующиеся специфически флуоресцирующие комплексы антиген-антитело детектируют с помощью люминесцентной микроскопии [140]. На территории РФ диагностическое исследование материала на ВБ МФА осуществляют с помощью специфических поликлональных флуоресцирующих антирабических антител производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань, Россия), ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, Россия) и ФГБНУ ВНИТИБП (г. Щелково, Россия). Наиболее распространенным красителем для флуоресцентного мечения антител в настоящее время признан флуоресцеинизотиоцианат. Успешная конъюгация ФИТЦ с антителами и другими органическими соединениями делает его особенно привлекательным для исследователей, занимающихся самостоятельным получением диагностикумов. Литературные данные свидетельствуют о возможности эффективного применения моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ при исследовании материала МФА [23]. Исследование МФА в среднем занимает не более 6 ч, также метод обладает высокой степенью чувствительности (порог чувствительности составляет около $3,8 \text{ Ig LD}_{50}/\text{мл}$) и специфичности. Вышеописанные характеристики МФА позволили данному методу стать значимым элементом современной системы диагностики бешенства.

Простота в исполнении, доступность для применения в условиях практически любой лаборатории и высокая степень чувствительности позволяют сделать вывод о возможности успешного применения МФА на этапах производства АИГ. В частности, применение метода актуально при исследовании образцов мозговой ткани подопытных животных, используемых при исследовании вирусосодержащего материала в реакции нейтрализации и при титровании вируса бешенства на белых мышах, с целью подтверждения их гибели в результате лабораторного бешенства, а не по иным причинам. Метод также может быть использован для контроля воспроизведения вируса в клеточных культурах при получении культурального антигена ВБ [190].

Метод атомно-силовой микроскопии, в настоящее время активно используемый для изучения наноразмерной структуры поверхности разнообразных микрообъектов, в том числе и биологической природы, позволяет получать информацию относительно размера, физических свойств объектов и их изменении в условиях воздействия внешних факторов. Данный метод позволяет изучить строение вирусных частиц при условии их предварительной фиксации на твердом носителе, в роли которого, как правило, выступает графит или слюда, открывает возможности изучения влияния вирусов на живые клетки. В экспериментах с применением атомно-силовой микроскопии было показано увеличение шероховатости поверхности клеток Vero вследствие воздействия вируса бешенства [16]. В этой связи применение метода перспективно для контроля полноты инактивации вирусосодержащих субстанций, а также для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина [20].

Электронная микроскопия относится к методам визуализации вирусных частиц, позволяющим получать данные относительно размеров, формы вирусов, их расположения в клетке, а также внутриклеточных изменениях, возникающих в результате инфицирования вирусом. Данный метод нашел применение не только в фундаментальных исследованиях, но и в сфере диагностики, экологии и

биотехнологии [72]. Главным достоинством электронной микроскопии является отсутствие специфичности к каким-либо вирусам, что позволяет успешно проводить работу с неидентифицированным материалом. К недостаткам метода можно отнести достаточно высокую концентрацию вирусных частиц, необходимую для проведения исследования – 10^7 вирусных частиц/мл [189]. В настоящее время данную проблему решают комплексные подходы по очистке и концентрации вирусосодержащих суспензий [38], что открывает возможность использования метода не только для проведения фундаментальных исследований [146], но и для задач производства [72].

Иммуноферментный анализ (ИФА) основан на явлении специфического взаимодействия ВБ с антирабическими антителами, иммобилизованными на носителе. Данный метод позволяет проводить качественный и количественный анализ. В России при постановке ИФА применяют конъюгат антирабических антител с пероксидазой (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань). Иммуноферментный анализ можно охарактеризовать как метод со средней степенью чувствительности: положительную реакцию отмечают при наличии в образце ВБ в концентрации свыше $3,3 \lg LD_{50}/мл$ [26]. Результаты, получаемые при исследовании образцов в ИФА, в достаточной степени коррелируют с результатами МФА [88,175,197]. При сравнении результатов исследования в ИФА антирабических сывороток с результатами РН на культуре клеток также была обнаружена сильная корреляция [200]. В работе M. Stantic-Pavlinic et al. [208] показано наличие корреляции между результатами, полученными методом непрямого ИФА и в FAVN-тесте, но при этом была отмечена более низкая степень чувствительности ИФА. Ряд исследований свидетельствует о негативном опыте применения иммуноферментного анализа при диагностике бешенства, что может быть связано с особенностями разработки ИФА-диагностикумов [199,218].

ИФА принадлежит к относительно экономичным диагностическим тестам, автоматизированный учет результатов анализа позволяет исключить риск ошибки оператора при исследовании большого числа проб. К преимуществам ИФА

следует отнести возможность выявления инактивированного ВБ, а также его отдельных антигенов. Более того, метод позволяет проводить количественную оценку содержания антигена ВБ или антител к нему, присутствующих в опытном образце. Применение ИФА рекомендовано для оценки показателя специфической активности сывороточных препаратов [196], антирабических вакцин и их компонентов [52,96,97]. Использование моноклональных антител к антигенному сайту III гликопротеина ВБ в ИФА открыло возможность исследования содержания иммуногенных компонентов вакцины и вируснейтрализующих антител в сывороточных препаратах [154,157]. В настоящее время ИФА включен в перечень обязательных тестов при диагностическом исследовании материала на ВБ [22].

Дот-иммуноанализ – разновидность иммуноферментного анализа, отличающаяся возможностью быстрого проведения исследований опытных образцов без необходимости использования какого-либо оборудования. В данном тесте в качестве носителя для адсорбции антигенов или антител применяют нитроцеллюлозную мембрану [90]. В случае образования комплексов между антигеном и специфическим к нему антителом на поверхности мембраны проявляются яркие хорошо различимые пятна, позволяющие осуществлять качественный и количественный визуальный учет результатов анализа. Для выявления продуктов ДИА часто применяют наночастицы коллоидных металлов, в частности, золота или серебра, обладающие высокой интенсивностью окрашивания и позволяющие осуществлять учет результатов теста без применения специализированного оборудования [104,131]. Постановка дот-анализа проста в выполнении и характеризуется низкой стоимостью относительно других экспресс-тестов, что обуславливает привлекательность данного метода для исследователей.

В работе Шарповой Н.А. рассмотрен вопрос применения ДИА на этапах производства препарата гетерологичного АИГ [99]. Диагностическая тест-система с применением наночастиц коллоидного золота, разработанная в ФКУЗ

РосНИПЧИ «Микроб» (Россия), показала свою эффективность при определении показателя специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в ДИА, а результаты данного теста коррелировали с результатами РН на белых мышах. Благодаря возможности выявления инактивированного антигена, разновидности иммуноферментного анализа также могут быть использованы для количественной оценки антигена в материале для иммунизации животных-продуцентов АРС.

Реакция диффузионной преципитации (РДП) основана на способности антигена ВБ и специфических к нему антител диффундировать в агаре навстречу друг другу с образованием линии преципитации. Постановка РДП проста в исполнении, не занимает много времени и не требует применения дорогостоящего оборудования [26]. Детекция ВБ в РДП возможна при условии наличия в опытном образце вируса в концентрации не менее $4,5 \lg LD_{50}/мл$, что указывает на низкую чувствительность метода в сравнении с биопробой на белых мышах [64]. Низкая чувствительность ограничивает использование данного метода, как в диагностических, так и в производственных целях.

Более совершенным методом анализа по сравнению с РДП является **иммуноэлектрофорез**, использование которого показано при исследовании активности АРС. Экспериментальные данные свидетельствуют о наличии сильной корреляции (79,7%) между результатами, полученными в иммуноэлектрофорезе и реакции нейтрализации ВБ *in vivo* [203]. Эффективность метода также показана при количественной оценке содержания гликопротеина ВБ в вакцинах [14]. В рамках производства препарата АИГ метод иммуноэлектрофореза может быть применен для оценки эффективности гипериммунизации продуцентов антирабической сыворотки и активности антигена, вводимого животным-продуцентам.

Применение в производстве гетерологичного АИГ таких классических серологических методов, как реакция гемагглютинации, реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации, имеет ограничения вследствие

ряда факторов. Несмотря на очевидные преимущества в виде снижения продолжительности анализа и простоты постановки данные тесты характеризуются низкой степенью чувствительности по сравнению с ИФА [136]. К недостаткам РНГА следует отнести применение нестабильных биологических компонентов при конструировании диагностикумов. Альтернативой эритроцитам, применяемым в РНГА, признано использование латексных частиц. Реакция агглютинации латексных частиц зарекомендовала себя как быстрый и высокоспецифичный метод для проведения анализа в полевых условиях [167]. Данные исследований свидетельствуют о наличии корреляции между результатами, полученными в реакции гемагглютинации и в RFFIT [195]. Получение достоверных результатов данным методом во многом зависит от размеров латексных частиц, условий их адсорбции, времени реакции и ряда других условий (рН, ионная сила, температура). Применение РСК в производстве АИГ ограничено возможностью достоверного количественного определения ВНА данным методом [87].

Современную разработку в области экспресс-диагностики бешенства представляют собой **иммунохроматографические тесты**. Как и в случае постановки ДИА, выявление комплекса антиген-антитело связано с применением коллоидных наночастиц. Преимущество данных тестов заключается в получении результатов в максимально сокращенные сроки без использования лабораторного оборудования и манипуляций с живым вирусом и клеточной культурой. Появление линии в тестовой зоне устройства после внесения опытного образца свидетельствует об успешной постановке теста, а появление линии в зоне контроля – о присутствии в опытном образце вируса бешенства или антирабических антител, в зависимости от вида теста [155,156]. Применение высокоспецифичных иммунохроматографических тестов с чувствительностью 0,5 МЕ/мл для детекции ВНА показано при исследовании иммуногенности антирабических вакцин [217]. Исследование в иммунохроматографическом тесте образцов сывороток крови людей на наличие антирабических ВНА выявило

среднюю корреляцию между результатами данного теста и RFFIT [201]. Некоторыми исследователями отмечена низкая специфичность иммунохроматографических тест-систем при анализе образцов человеческой мозговой ткани и тканей мозга животных [102], что ограничивает их диагностическое использование [170]. Тем не менее, благодаря высокой чувствительности и простоте применения иммунохроматографические тесты могут успешно дополнить комплекс контрольных тестов, используемых в производстве антирабических вакцин и сывороточных препаратов, в том числе и в производстве гетерологичного АИГ.

Применение в исследованиях на ВБ высокочувствительного и специфичного метода **проточной цитометрии** открывает возможности автоматизированного высокоточного количественного учета антигена ВБ в материале. Технология импульсной проточной цитометрии позволяет вести учет вирусного антигена в клеточной культуре на основании интенсивности иммунофлуоресцентного свечения, излучаемого инфицированными клетками, обработанными диагностическим флуоресцирующим антирабическим конъюгатом [192]. Помимо детекции ВБ, метод проточной цитометрии успешно применяют при определении уровня защитных антител в сыворотках крови животных [215]. Исследование методом проточной цитометрии проводят с применением диагностикумов для люминесцентной микроскопии [42,111]. К важным преимуществам метода стоит отнести автоматизированный учет результатов, позволяющий минимизировать риск ошибки при анализе большого числа проб, высокую чувствительность и относительно небольшое время проведения исследования: до 3 сут, включая стадию выращивания вируса на культуре клеток. К недостаткам метода следует отнести необходимость в сложном дорогостоящем оборудовании, а также специалистах, владеющих навыками работы с проточным цитометром. Результаты, полученные методом проточной цитометрии, хорошо коррелируют с результатами биопробы на животных и клеточной культуре [110,215]. В производстве препарата АИГ данный метод перспективен на этапе определения

показателя специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина [19].

Обнаружение ВБ на клеточных культурах возможно и без применения флуоресцентных диагностикумов. К таким способам исследования следует отнести **метод образования бляшек**, основанный на образовании погибших под влиянием вируса клеток в монослойных культурах, залитых агаром. При условии большого разведения ВБ, где исключена возможность множественного инфицирования клеток и слияния групп зараженных клеток, каждую бляшку приравнивают к одной вирусной частице, содержащейся в исследуемом материале. При данном методе исследования концентрацию вируса указывают в бляшкообразующих единицах [31]. К недостаткам метода следует отнести длительность постановки, трудоемкость, в частности при исследовании материала с большим титром ВБ [11]. Кроме того, ВБ способен оказывать цитопатическое действие на клеточные культуры, проявляющееся в разрушении отдельных групп клеток или всего монослоя. Ряд исследований свидетельствует о возможности определения активности ВБ и титра антирабических антител в сыворотках крови по **цитопатическому действию** [33,82]. Данное исследование занимает в среднем 5-7 сут, чувствительность теста ниже в сравнении с методом образования бляшек. Как правило, к концу срока исследования происходит естественное отмирание неинфицированных вирусом клеток монослоя, что значительно усложняет процедуру учета итогов теста.

Вторая группа методов исследования материала на ВБ представлена методами выделения ВБ на животных и на вирусвосприимчивой культуре клеток.

Биологическая проба – наиболее высокочувствительный метод исследования, является неотъемлемой частью комплекса диагностических тестов на бешенство, а также методом контроля показателя специфической активности препарата гетерологичного АИГ. Для выделения ВБ биологическая проба впервые была применена Webster и Dawson [219]. Данный метод отличается трудоемкостью и по скорости постановки значительно уступает тестам *in vitro* [193,208].

В сфере диагностики бешенства данный метод применяют для постановки окончательного диагноза. В области производства антирабических лекарственных средств метод биологической пробы применяют для исследования таких показателей, как иммуногенность, подлинность, специфическая активность, специфическая безопасность. В производстве гетерологичного АИГ биологический метод используют при определении активности штаммов фиксированного вируса бешенства, применяемых для приготовления антигена или контрольных исследований, а также для определения вируснейтрализующей активности антирабического иммуноглобулина.

К альтернативным вариантам биологической пробы на мышах относят **выделение вируса бешенства на восприимчивой клеточной культуре** [160]. В диагностике бешенства применяют клеточные линии мышинной нейробластомы (CCL-131) и невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). В экспериментальных исследованиях выявление ВБ также осуществляют на клеточных линиях ВНК (клетки почки сирийского хомячка), А-72 (клетки фибросаркомы собаки), ПС (клетки почки сайги), Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки), MDBK (клетки почки быка) и др. Постановка биопробы на культуре клеток занимает значительно меньше времени по сравнению с тестом *in vivo* [193], что позволяет существенно сократить сроки установления диагноза, и дает возможность одновременного исследования большого числа проб. Результаты исследований указывают на наличие сильной корреляции между результатами, полученными методами биопробы на мышах и на клеточной культуре [95,118]. К недостаткам метода следует отнести необходимость в проведении контроля качества клеточных культур, а также дорогостоящем оборудовании, специализированном помещении для выращивания клеточных культур и специалистах по работе с клеточными линиями.

Главное преимущество метода биологической пробы состоит в возможности учета исключительно вируснейтрализующих антирабических антител за счет использования в тесте живых биологических систем. Данное свойство биопробы

имеет значение при оценке протективных свойств антирабических препаратов.

Третья группа представлена совокупностью методов, основанных на нейтрализации живого вируса бешенства антирабическими антителами с последующим его обнаружением. Выполнение указанных методов позволяет определить уровень специфических антител в опытном образце. В практической работе для этой цели часто используют методические приемы *in vivo* (реакция нейтрализации на мышах) и *in vitro* (FAVN-test, RFFIT). К этой группе также можно отнести вышеописанные методы образования бляшек, титрования по цитопатическому действию и метод проточной цитометрии.

Суть реакции нейтрализации ВБ *in vivo* состоит в интрацеребральном введении разделенным на группы подопытным животным суспензий ВБ, предварительно нейтрализованного специфическими антирабическими антителами (АИГ), взятыми в различных титрах. На основании падежа животных в опытных группах вычисляют значения титра ВНА.

Для оценки иммунитета у животных, привитых против бешенства, ВОЗ рекомендует применение **FAVN-теста** и **RFFIT**, суть которых заключается в осуществлении реакции нейтрализации ВБ на вирусвосприимчивой клеточной культуре [120,173,224]. Основными отличиями FAVN-теста от RFFIT являются применение 96-луночных культуральных планшетов взамен 8-камерной посуде Lab-Tek, а также подходы к учету результата. При выполнении FAVN-теста применяют качественный подход к обнаружению фокусов флуоресценции на общей поверхности в каждой лунке, а при выполнении RFFIT учитывают количество полей со специфической флуоресценцией. Методы с использованием клеточных культур коррелируют с методом нейтрализации ВБ на белых мышах [119,205].

При исследовании уровня вируснейтрализующих антител в FAVN-тесте и RFFIT рекомендовано использование клеточной линии ВНК-21 и штамма вируса бешенства CVS-11. Осуществление реакции нейтрализации аналогичной данным тестам возможно и при использовании ряда других вирусвосприимчивых

клеточных линий и фиксированных аттенуированных штаммов ВБ [8,95,106].

С точки зрения повышения биологической безопасности актуальна разработка модификаций метода с применением клеточных культур, предполагающих использование непатогенных штаммов ВБ, или близкородственных вирусов, например, вируса везикулярного стоматита [176]. К другим аспектам усовершенствования данного метода *in vitro* следует отнести применение генномодифицированных штаммов ВБ, способных к продукции флуоресцирующего белка [186], позволяющее исключить этап окрашивания и сократить время исследования при условии сохранения достоверности теста.

В настоящее время в России существует несколько аккредитованных лабораторий, проводящих исследования сывороток крови животных с использованием клеточных культур. Применение метода определения титра антирабических антител *in vitro* актуально на этапе контроля антирабических вакцин для животных [158]. Разработка и внедрение подобных методов в производство антирабических лекарственных средств в настоящее время является актуальной темой, которая требует дополнительного изучения [58].

Применение в производстве АИГ реакции нейтрализации на культуре клеток открывает возможности ускоренного исследования большего количества образцов АРС и готовых серий препарата АИГ (3 сут против 14 сут при постановке РН на белых мышах). Применение данного метода исследования в перспективе будет способствовать исследованию процесса образования антител каждого животного-продуцента на различных этапах его иммунизации рабическим антигеном. Полученные сведения могли бы быть полезными при разработке альтернативных схем иммунизации продуцентов АРС.

Четвертая группа представлена методами выявления генома инфекционного агента. Методы молекулярной генетики в наши дни активно применяют в сфере диагностики заболеваний и типирования самых разных микроорганизмов, в том числе и лиссавирусов. Современные молекулярно-генетические методы характеризуются высокой чувствительностью, позволяют проводить исследования

с различными видами патологического материала [127,143]. К особенностям молекулярно-генетических методов при работе с ВБ следует отнести проведение этапа обратной транскрипции. К настоящему времени для исследования материала на ВБ разработаны диагностические наборы для ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), позволяющие учитывать результаты анализа методом гель-электрофореза или при помощи флуоресцентных меток [27,41]. Данный высокочувствительный метод (1-10 LD₅₀/мл), способный детектировать низкие концентрации вируса бешенства в образце, играет важную роль в осуществлении прижизненной диагностики бешенства [125,179], а также при проведении штаммовой дифференциации ВБ [108,112]. Применение ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов позволяет определять выход продукта реакции по итогам каждого цикла амплификации и рассчитывать относительную концентрацию субстрата с использованием калибровочной кривой, построенной на основании полученных данных [79]. В производстве АИГ метод ОТ-ПЦР нашел применение при количественной оценке содержания антигена в материале для иммунизации животных-продуцентов антирабической сыворотки [53]. ОТ-ПЦР в комплексе с методами иммунофлуоресценции также применяют для оценки полноты инактивации ВБ при изготовлении антирабических вакцин [177,178,198].

Применение молекулярно-генетических методов актуально и в области исследования генетической стабильности штаммов ВБ, используемых при производстве антирабических лекарственных средств. Исследование стабильности вирусных штаммов осуществляют с применением ОТ-ПЦР и полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование вакцинных штаммов ВБ проводят как на территории РФ [48,91,174], так и за рубежом [162,183,211,226]. Секвенирование вирусного генома позволяет подтвердить или опровергнуть возможность реверсии штаммов ВБ, используемых при получении оральных антирабических вакцин [37,100]. В производстве метод секвенирования генома нашел применение при проведении исследований на молекулярно-

генетическую стабильность и подлинность штаммов вируса бешенства, используемых при получении антирабических препаратов [39]. Метод секвенирования позволяет исследовать географическое распространение изолятов ВБ, в том числе с целью осуществления надлежащего эпидемиологического надзора, и изучать эволюционные пути отдельных штаммов.

Обзор существующих в настоящее время методов исследования материала на ВБ и антитела к нему показал широту их применения в сферах диагностики, экспериментальных исследований и производства лекарственных препаратов для профилактики бешенства. Следует отметить актуальность применения в производстве препарата АИГ таких методов, как ИФА, МФА, проточная цитометрия, атомно-силовая микроскопия, а также методов с применением клеточных культур. Указанные методы по сравнению с реакцией вируснейтрализации *in vivo* при сохранении высокой чувствительности и специфичности обладают такими преимуществами, как уменьшение времени постановки анализа, возможность одновременного исследования большого числа образцов, и, в ряде случаев, возможность автоматизированного учета результатов. В перспективе применение тестов *in vitro* позволит расширить спектр контрольных методов в производстве препарата гетерологичного АИГ в соответствии с требованиями международных нормативных документов. Рутинный анализ образцов в экспресс-тестах *in vitro* позволит дать оценку эффективности иммунизационных мероприятий, как для групп, так и для каждого отдельно взятого продуцента АРС. Полученные данные смогут указать пути дальнейшего совершенствования отдельных этапов производства АИГ с целью повышения качества конечного продукта.

1.3 Стандартные образцы и их применение в производстве антирабического иммуноглобулина

Качество лекарственного средства является неотъемлемой частью полноценного оказания медицинской помощи человеку. При этом вопрос качества

антирабического иммуноглобулина имеет особое значение, поскольку указанный препарат предназначен для постэкспозиционной профилактики болезни с абсолютной летальностью. Выводы о качестве лекарственного средства должны быть обоснованы результатами анализа о его соответствии утвержденным спецификациям, а риск принятия некорректного заключения о качестве лекарственного средства должен быть минимальным. Поскольку оценка качества связана с вариабельностью биологических систем, помимо метода исследования, неотъемлемой частью аналитической системы является стандартный образец (СО) [15].

Согласно XIV изданию Государственной Фармакопеи (ГФ) РФ, «стандартными образцами называют вещества, посредством сравнения с которыми осуществляют контроль качества исследуемых лекарственных средств при помощи физико-химических и биологических методов для подтверждения их соответствия требованиям нормативной документации, утвержденным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств для осуществления контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств» [69]. При этом стандартный образец не является лекарственным препаратом [54]. Применение СО необходимо и для совершенствования подходов и требований к процедуре контроля качества лекарственных средств.

СО принято классифицировать по процедуре аттестации, природе веществ, входящих в состав образца, и уровню признания. В зависимости от процедуры аттестации СО разделяют на первичные и вторичные. Первичный образец наделен необходимыми свойствами для целенаправленного использования, аттестацию такого образца проводят без сравнения с существующими СО. Ко вторичным относят СО, аттестованные в результате сравнения с первичными [46].

По уровню признания стандартные образцы подразделяют на международные, межгосударственные, государственные, отраслевые и стандартные образцы предприятий (СОП). Активность международного СО выражают в

международных единицах (МЕ). Эквивалентность международных единиц международного СО утверждает ВОЗ. Как правило, международные СО относят к категории первичных образцов [69].

Межгосударственный СО признан в рамках Европейского союза или Евроазиатского экономического союза в соответствии с установленными правилами и применяется в государствах, присоединившихся к его признанию. Термины «государственный СО» и «отраслевой СО» в настоящее время объединены в понятие «фармакопейный СО» [55].

Стандартным образцом предприятия считается образец, утвержденный в установленном порядке и применяемый в соответствии с нормативными документами предприятия, аттестуемый в установленном порядке с использованием международных или фармакопейных СО и являющийся, как правило, вторичным СО. В порядке исключения для новых лекарственных средств, при условии отсутствия международных или фармакопейных СО, СОП могут считаться первичными. Кандидаты в фармакопейные стандартные образцы или СОП испытывают с помощью соответствующих аналитических методов, включенных в разработанный нормативный документ. Для их аттестации необходимо соответствие кандидата требованиям определенной фармакопейной статьи или общей фармакопейной статьи ГФ РФ, другие подходы должны быть обоснованы.

Следует отметить, что производство международных и межгосударственных СО не имеет больших объемов, их применение целесообразно исключительно при разработке и аттестации вторичных стандартных образцов – фармакопейных и СОП. В свою очередь фармакопейные и СОП необходимо использовать при осуществлении рутинных диагностических исследований и для контроля этапов производства лекарственных средств [12].

В производстве антирабических препаратов также существует необходимость в использовании вторичных стандартных образцов на этапе осуществления контроля качества. Для контроля специфической активности

гетерологичного АИГ в реакции нейтрализации на белых мышах ранее разработаны соответствующие СОП (СОП 32-04-17, СОП 32-05-20), аттестованные с применением международного СО иммуноглобулина человеческого против бешенства [2]. При этом в качестве кандидата в СОП использовали антирабический иммуноглобулин, полученный из сыворотки крови лошади. Такая практика согласуется с опытом зарубежных исследователей, которые для приготовления вторичных стандартов использовали антирабический иммуноглобулин, полученный из сыворотки крови человека [212]. Помимо указанных стандартных образцов, в российском производстве гетерологичного АИГ применяют СОП для контрольных исследований содержания белка биуретовым методом (СОП 05-10-19, 05-11-21) и содержания остаточного этанола в препарате методом газовой хроматографии (СОП 37-02-18).

Разработка метода определения специфической активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина с применением клеточных культур также указывает на необходимость использования соответствующего СО, как компонента аналитической системы. В контексте настоящих исследований целесообразна разработка СО предприятия с применением в качестве образца сравнения международных СО.

Заключение по обзору литературы

Предупреждение случаев заболевания бешенством во многом зависит от оказания своевременной и качественной антирабической помощи. В связи с этим особого внимания требует процесс производства и контроля качества препаратов для профилактики бешенства, одним из которых является гетерологичный антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади. Совершенствованию этапов производства препарата может способствовать применение современных методов исследования, характеризующихся высоким уровнем чувствительности, специфичностью, скоростью постановки, автоматизацией процесса учета результатов анализа, возможностью

одновременного исследования большого числа проб. Проанализировав имеющиеся на сегодняшний день методы исследования материала на ВБ и антитела к нему, был сделан вывод, что среди современных методов *in vitro* в условиях производства препарата при определении показателя специфической активности АРС и готового иммуноглобулина одним из наиболее перспективных является метод нейтрализации ВБ на клеточной культуре. К основным преимуществам указанного метода относятся сокращение срока проведения анализа с 14 до 3 сут, исключение работы с большим количеством стандартных лабораторных животных, увеличение количества одновременных исследований образцов при условии сохранения высокой чувствительности и специфичности.

Важно отметить, что перспектива применения в производстве препарата АИГ указанного методического приема диктует необходимость разработки соответствующего стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина, поскольку метод контроля и стандартный образец представляют собой единую аналитическую систему, позволяющую оценить свойства препарата [15].

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования с применением патогенных биологических агентов III группы патогенности осуществляли согласно требованиям санитарных правил СП 1.3.2322-2008 «Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [83], СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» [80], методических указаний МУ 3.3.1.1099-2002 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» [62], фармакопейной статьи предприятия ФСП Р N002639/01-250210 «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций», изм. № 1-5, раздела «Специфическая активность», промышленного регламента ПР № 01898109-56-19 на производство «Имуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади жидкого, раствора для инъекций».

2.1 Материалы

2.1.1 Штаммы вируса бешенства

Получение антигенного материала (рибонуклеопротеина) и контроль уровня вируснейтрализующих антител в антирабических сыворотках и имуноглобулине на модели культуры клеток осуществляли с использованием штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Verо}» (активность составляет от 4,0 до 8,0 ID₅₀/мл). Указанный штамм был получен путем многократного пассирования (пассаж 180) на клеточной культуре Verо из штамма ВБ «Москва 3253» (показатель активности не менее 10^{-4,8}/мл). Активность антирабических сывороток и препарата имуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышах исследовали с

применением контрольного штамма фиксированного вируса бешенства «CVS» (активность не менее $10^{-5,3}$ /мл). Штаммы вируса бешенства «CVS» и «Москва 3253» (III группа патогенности) получены из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2.1.2 Сыворотки и препараты

В работе использовали образцы антирабических лошадиных сывороток (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия); «Имуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия); антигенный диагностикум с наночастицами коллоидного золота, приготовленный согласно ранее разработанной методике [73,99]; «Антирабический лиофилизированный иммуноглобулин, меченный флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-иммуноглобулин)» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия); «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Россия).

В качестве адьювантов при иммунизации животных-производителей сыворотки, содержащей антитела к РНП вируса бешенства «Москва 3253_{vero}», применяли полиоксидоний (лиофилизат, Петровакс Фарм, Россия) и коллоидное золото (размер наночастиц 14-17 нм, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия). Перед процедурой тотального обескровливания кроликам вводили комбинацию препаратов «Ксила» (Interchemie werken «De Adelaar» B.V., Нидерланды) и «Золетил» (Virbac, Франция). Для отрицательного контроля реакции нейтрализации применяли нормальные сыворотки крови лошади (Биолот, Россия).

В реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышях использовали СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического (32-04-17,

32-05-20, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия). Нейтрализацию вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на культуре клеток проводили с использованием Европейского стандартного образца иммуноглобулина человеческого против бешенства (Human rabies immunoglobulin BRP batch 1; показатель активности 91 МЕ/мл, Merck, Германия) и СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток (41-01-20, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия).

2.1.3 Вирусные антигены

В экспериментах использовали антиген культурального происхождения – концентрированную суспензию штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», репродуцируемого на культуре Vero; рибонуклеопротеин, выделенный из цитоплазмы клеточной культуры Vero, инфицированной вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}», по модифицированному методу M. Dastkhosh [126], изложенному в разделе 2.2.4.

2.1.4 Клеточные культуры

При разработке метода контроля уровня вируснейтрализующих антител в условиях *in vitro* использовали клеточные культуры Vero (B) (170-180 пассаж) и ВНК-21 (неопределенный пассаж). Обе клеточные линии были получены из коллекции Биолот (Россия), предварительно исследованы на отсутствие микоплазм.

2.1.5 Экспериментальные животные

В качестве продуцентов сыворотки, содержащей антитела к РНП ВБ штамма «Москва 3253_{Vero}», использовали кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) породы «Шиншилла» массой 1,5-2,5 кг. При постановке классической РН вируса бешенства *in vivo* использовали белых мышей (*Mus musculus*, инбредная линия

BALB/c) массой 10-12 г. Лошадей рысистой породы (*Equus ferus caballus*) весом более 400 кг использовали в качестве продуцентов антирабической сыворотки, исследуемой в РН на белых мышах и клеточной культуре по показателю «специфическая активность».

Животные предоставлены питомником по разведению экспериментальных животных, организованным на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Работу с животными проводили согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [28], «Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях» [40], приказом МЗ РФ от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» [77]. Экспериментальных животных содержали в условиях, соответствующих «Положению о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [76].

2.1.6 Реактивы, растворы и питательные среды

Культивирование вируса бешенства «Москва 3253_{vero}» и клеточных линий Vero и ВНК-21 проводили с использованием: питательной среды Игла MEM жидкой, с L-глутамином (Биолот, Россия); питательной среды 199 жидкой, с L-глутамином (Биолот, Россия); раствора Дульбекко (DPBS) без Ca²⁺ и Mg²⁺ (Биолот, Россия); смеси сухой пенициллина G (50000 ЕД/фл) и стрептомицина (50 мг/фл) для клеточных культур (Биолот, Россия); раствора версена 0,02 % (Биолот, Россия); раствора трипсина 0,25 % (Биолот, Россия); сыворотки из крови крупного рогатого скота жидкой для культур клеток (Биолот, Россия). Воду очищенную (ФС.2.2.0020.18), воду для инъекций (ФС.2.2.0019.18), деионизованную воду использовали на этапах приготовления растворов.

Для приготовления экспериментальной питательной среды навеску ФГФ растворяли в стерильном солевом растворе Эрла (Биолот, Россия) или Хенкса

(Биолот, Россия) и последовательно фильтровали через мембранные фильтры (Sartorius, Германия) с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм.

При выделении РНП из вируса бешенства «Москва 3253_{Verо}» использовали: раствор хлористого натрия 0,85 % (Вектон, Россия), раствор фенолметилсульфонилфлуорида (PMSF) 0,2 ммоль/л (AppliChem, Германия).

Для проведения электрофореза и выявления белков использовали 12 % полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН, Bio-Rad, США), маркеры молекулярной массы (Bio-Rad, США), Кумасси синий R-250 (AppliChem, Германия), 1 % агар Дифко (Becton Dickinson, США), веронал-мединаловый буфер pH (8,6±0,1) с ионной силой 0,025 (Sigma-Aldrich, США).

При подготовке материала для иммунизации животных применяли 0,85 % раствор хлористого натрия (Вектон, Россия). В качестве консерванта для сывороток, содержащих антитела к РНП, использовали раствор хинозола (Merck, Германия), добавляемый в количестве 0,5 мл на 100 мл сыворотки.

При постановке дот-иммуноанализа для осуществления блокировки свободных сайтов связывания применяли 3 % раствор бычьего сывороточного альбумина (Биолот, Россия), для усиления цветового сигнала использовали 0,2 % раствор нитрата серебра (Вектон, Россия), 0,5 % раствор лимонной кислоты (Вектон, Россия), 0,2 % раствор метола (Вектон, Россия).

На этапе выделения антител к РНП из полученных от продуцентов сывороток использовали воду очищенную (ФС.2.2.0020.18), раствор сульфата аммония (Вектон, Россия), сефадекс G-25 и G-50 (Sigma-Aldrich, США), 10 % карбонатно-бикарбонатный буфер (Росмедбио, Россия), 5 % сульфосалициловую кислоту (Вектон, Россия), реактив Несслера (Вектон, Россия), 0,85 % раствор хлористого натрия (Вектон, Россия).

При получении экспериментальных диагностических конъюгатов в качестве флуоресцентных меток использовали флуоресцеинизотиоцианат (Biotium, США) и Alexa Fluor (532 нм, Monoclonal Antibody Labeling Kit; Thermo-Fisher Scientific, США).

При постановке реакции нейтрализации вируса бешенства *in vitro* использовали: для фиксации инфицированного вирусом бешенства «Москва 3253_{Vero}» клеточного монослоя в микропланшете и инактивации вируса – охлажденный до минус 20 °С 80 % водный раствор ацетона (Вектон, Россия) или 4 % раствор формальдегида (Вектон, Россия); для промывания микропланшета от фиксатора и окрашивающего препарата – натрий-фосфатный буфер (рН 7,2, 0,1 моль/л, Вектон, Россия).

Окрашивание клеточных культур осуществляли с применением диагностического антирабического иммуноглобулина, меченого ФИТЦ (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия), а также некоммерческими флуоресцентными конъюгатами собственного изготовления.

2.1.7 Оборудование и приборы

Манипуляции с клеточными культурами и вирусом бешенства выполняли в боксах микробиологической безопасности II класса (тип А2) БАВп-01-«Ламинар-С»-1,5 (210.150.01) и БМБ-III-«Ламинар-С»-1,8 (Ламинарные системы, Россия).

Для осаждения клеточных культур, отделения вирусосодержащей жидкости от клеточного дебриса, осаждения суспензий использовали центрифуги СМ-6 (Elmi, Латвия) и Sigma 2K15 (Sigma, Германия). Очистку белковых растворов проводили на жидкостном хроматографе Biologic Duoflow Chromatography system (Bio-Rad, США).

Клеточную культуру и вирус бешенства культивировали в инкубаторе с углекислой средой MCO-15AC (Sanyo, Япония).

Контроль качества пересева клеточной культуры, а также исследования, основанные на применении иммунофлуоресценции, осуществляли с помощью инвертированного микроскопа (Микромед, Россия). Подсчет клеточной культуры осуществляли с помощью камеры Горяева (МиниМед, Россия).

Сухой ФГФ получали из отхода производства препарата АИГ – фибрина, с применением вакуум-выпарной установки УВВ-50 (Институт прикладной биохимии).

мии и машиностроения, Россия) и установки распылительного типа КЯУЛ 101325.002 (Элмаш-Микро, Россия).

Для определения концентрации белковых растворов использовали фотоэлектроколориметр КФК-2МП (Загорский оптико-механический завод, Россия) и спектрофотометр Biowave II (Biochrom, Великобритания).

Определение спектрометрических характеристик флуорохромов осуществляли с использованием спектрометра высокого разрешения HR4000 (Ocean Optics, США).

Электрофорез осуществляли с применением камеры Mini-Protean (Bio-Rad, США).

Получение очищенной воды, воды для инъекций и деионизованной воды осуществляли с применением следующего оборудования: установки комбинированной мембранной УВОИ-«М-Ф» 1812 F-6 (Медиана Фильтр, Россия); аквадистиллятора ДЭ-25 (Электромедоборудование, Россия); дистиллятора GFL 2002 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Германия); установки УВИ-0,15 (Мембранная техника и технология, Россия); деионизатора Elgastat UNQ (ELGA Lab Water, Великобритания).

Для инкубирования образцов исследования при необходимой температуре использовали термостат-водяную баню TW-2 (Elmi, Латвия); термостат ТС-1/80-СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия); холодильник лабораторный ХЛ-340 (Pozis, Россия).

Дозирование и розлив жидких образцов осуществляли с применением одноканальных и многоканальных механических дозаторов переменного объема на 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 30-300 мкл, 1-5 мл (Biohit, Финляндия), электронного пипеттора Biohit Midi Pro (Sartorius, Германия).

Измерение pH растворов и исследуемых образцов осуществляли с применением ионометра pH-150M (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь).

Для перемешивания растворов и жидких образцов использовали вортекс «V-1 plus» (Biosan, Латвия) и магнитную мешалку с электроподогревом ММ 2А (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь).

Получение лиофилизата РНП проводили на установке Alpha-I-5 (Martin Christ, Германия).

Для стерилизации лабораторной посуды и растворов использовали шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п (Смоленское СКТБ СПУ, Россия), стерилизатор паровой ВК-75 (Тюменский завод медицинского оборудования и инструментов, Россия).

Для хранения вирусосодержащего материала, клеточных культур, растворов, реагентов, питательных сред использовали холодильник «Атлант» МХМ 1847-46 (Атлант, Беларусь); холодильник бытовой «Саратов-1614М» КШ-160 (Саратовское электроагрегатное производственное объединение, Россия); вытяжной шкаф ШВ-202 (Фреска Лаб, Россия); горизонтальный низкотемпературный морозильник MDF-193 (Sanuo, Япония); сосуд криогенный СК-16 (Коростенский завод химического машиностроения, Украина).

2.2 Методы

2.2.1 Биотехнологические методы

Культуру клеток, предназначенных для репродукции вируса бешенства «Москва 3253_{vero}» с целью получения рибонуклеопротеина, а также для постановки теста нейтрализации вируса бешенства в условиях *in vitro*, выращивали стационарным способом в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 75 см² в течение 3-4 сут при 37 °С и в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ [92].

Для приготовления клеточной суспензии монослойную культуру однократно промывали раствором Дульбекко, затем клетки открепляли от поверхности смесью версена и трипсина (2:1) и суспендировали в питательной среде.

2.2.2 Вирусологические методы

Определение титра вируса и LD₅₀ осуществляли методом титрования на белых мышах. Для каждого разведения вируса «CVS» использовали по 10 животных. Наблюдение осуществляли в течение 14 сут, учитывая павших от бешенства животных в период с 5 по 14 день.

Вычисление ID₅₀ и определение титра вируса проводили методом титрования на культуре клеток Vero.

Специфическую активность образцов антирабических сывороток и препарата иммуноглобулина определяли в реакции нейтрализации вируса на белых мышах, а также в реакции нейтрализации вируса на культуре Vero. Параллельно определяли значение данного показателя для Международного СО специфической активности иммуноглобулина человека против бешенства и стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина, предназначенных для применения в реакции нейтрализации *in vivo*, а также значения специфической активности для аналогичных стандартов, предназначенных для постановки реакции нейтрализации *in vitro*.

2.2.3 Биологические методы

С целью получения сывороток крови, содержащих антитела к рибонуклеопротеину вируса бешенства, были иммунизированы три экспериментальные группы животных, состоящие из трех кроликов каждая. Подопытным животным в соответствующие сроки графика иммунизации вводили внутримышечно по 1 мл раствора рибонуклеопротеина вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», в том числе в комбинации с адьювантами. Наблюдение за подопытными животными осуществляли ежедневно на протяжении всего периода эксперимента (70 дней).

Забор крови, содержащей антитела к РНП вируса бешенства, осуществляли методом тотального обескровливания с соблюдением принципов биоэтики [21,40]. Перед забором крови подопытным животным вводили комбинацию

препаратов «Ксила» и «Золетил» в дозировке 0,15 и 0,1 мл на 1 кг массы животного соответственно. Объем смеси составлял 1,5 мл, в качестве растворителя использовали 0,85 % раствора хлористого натрия. Введение смеси осуществляли в краевую вену уха. Эффект от введения препаратов наблюдали через 10-20 с после инъекции.

2.2.4 Биохимические, биофизические, физико-химические и иммунохимические методы

Разрабатываемый способ определения активности антирабического иммуноглобулина имеет схожий с методическими приемами RFFIT и FAVN-test принцип работы и основан на обнаружении вируса бешенства в клеточных культурах с использованием иммунофлуоресценции [193]. Учет результатов нейтрализации вируса бешенства *in vitro* осуществляли с помощью люминесцентной микроскопии.

Титр антител в сыворотках крови от животных, иммунизированных РНП вируса бешенства «Москва 3253_{vero}», в том числе с добавлением адъювантов, определяли в прямом дот-иммуноанализе с применением диагностикума с наночастицами коллоидного золота (14-17 нм) по общепринятой методике [90]. В качестве твердой фазы для проведения анализа использовали нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad, США). Для блокировки свободных сайтов связывания перед внесением диагностикума осуществляли инкубирование мембраны в 3 % растворе бычьего сывороточного альбумина в течение 15 мин при температуре 20 °С. Для постановки отрицательного контроля использовали нормальную сыворотку кролика. Мембрану с нанесенными образцами сывороток и антигенного диагностикума инкубировали при 20 °С до проявления красных пятен. В случае необходимости усиления цветового сигнала мембрану с исследуемыми образцами вносили в раствор физического проявителя (деионизованная вода; 0,5 % раствор лимонной кислоты; 0,2 % раствор метола; 0,2 % раствор нитрата серебра), после чего промывали и высушивали при комнатной температуре. После завершения

анализа проводили визуальный учет результатов. За титр антител принимали наибольшее разведение образца сыворотки, при котором регистрировали визуально различимое пятно.

Выделение рибонуклеопротеина ВБ из цитоплазмы инфицированной культуры Vero проводили по модифицированному методу M. Dastkhosh [126]. Собранную инактивированную суспензию клеточной культуры осаждали на центрифуге при 900 g и 4 °C на протяжении 10 мин, после чего двукратно промывали 0,85 % раствором хлористого натрия. Для разрушения клеток к осадку добавляли 10 мл ледяной деионизованной воды с 0,2 мМ PMSF, а затем суспензию инкубировали при (6 ± 2) °C в емкости со льдом в течение 1 ч. Для отделения детрита от жидкости материал осаждали в течение 20 мин на центрифуге Sigma 2K15 (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Германия) при 1000 g и 4 °C. Лизис клеток и осаждение клеточного детрита осуществляли двукратно.

Получение сухого ФГФ осуществляли методом выпаривания, представляющим собой удаление жидкой фазы из раствора посредством нагревания [5]. Высушивание ФГФ осуществляли методом «псевдокипящего слоя» [17].

Определение содержания ВБ в питательной среде проводили неконкурентным методом ИФА [93].

Спектрометрический анализ и регистрацию спектральных характеристик конъюгатов антител с флуорохромами осуществляли с использованием спектрометра HR4000 (Ocean Optics, США). Для проведения исследования образцы конъюгатов вносили в кюветы, предназначенные для спектрально-фотометрического анализа в диапазоне длин волн от 220 до 1600 нм, размер которых составлял $(12,5\times 12,5\times 36)$ мм (Eppendorf, Германия). Перед началом измерений в программе управления спектрометром для исключения спектра растворителя и внешних световых излучений сохраняли опорный и темновой спектры, которые регистрировали при включенном и выключенном источнике излучения в отношении растворителя. Спектр света, проходящего через образец, ре-

гистрировали в 10 повторах. Полученные данные обрабатывали в программном обеспечении Spectra Suite и Origin™ для используемого прибора.

Концентрацию водородных ионов (pH) используемых растворов и субстанций определяли потенциометрическим методом [67].

Электрофоретические исследования проводили в 12 % ПААГ-ДСН [71]. Для выявления белков проводили окрашивание гелей Кумасси синим R-250 (AppliChem, Германия).

Содержание белка определяли спектрофотометрическим методом [68].

Получение сывороток, содержащих антитела к РНП вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}», проводили согласно стандартной методике [9].

Выделение иммуноглобулинов из сыворотки осуществляли методом осаждения сульфатом аммония [93]. Охлажденную воду очищенную смешивали с равным объемом сыворотки, после чего в полученный раствор при непрерывном помешивании на магнитной мешалке добавляли насыщенный раствор сернокислого аммония pH (7,2±0,1) из расчета 45 % конечного насыщения. Необходимое количество сульфата аммония для получения 45 % насыщения вычисляли по формуле:

$$X = Y \times B \div (100 - B),$$

где: X – необходимое количество (мл) насыщенного раствора сульфата аммония;

Y – общий объем разведенной сыворотки (мл);

B – необходимый процент насыщения.

Колбу с раствором помещали в холодильную камеру на 16-18 ч при (6±2) °С для получения осадка, затем центрифугировали (2400 g, 40-60 мин). Надосадочную жидкость, образовавшуюся в колбе, удаляли, а полученный осадок разбавляли минимальным объемом воды очищенной ((2,5±0,5) мл на 1 г осадка) и осуществляли очистку на хроматографической колонке с сефадексом G-50 (Sigma-Aldrich, США) [93].

Конъюгирование антител к РНП вируса бешенства с ФИТЦ осуществляли согласно руководству ВОЗ [173]. К раствору, содержащему антитела в концентрации 2 %, добавляли флуоресцеин-5-изотиоцианат из расчета 2-3 мг на 100 мг белка. Конъюгирование осуществляли при (7 ± 3) °С в течение 17-19 ч при постоянном помешивании на магнитной мешалке. Для очистки ФИТЦ-конъюгата от несвязанного с белком флуорохрома использовали хроматографические колонки с сефадексом G-50 (Sigma-Aldrich, США). Элюирование антител, меченных ФИТЦ, осуществляли 0,85 % раствором хлористого натрия с 5 % карбонатно-бикарбонатным буфером.

Получение конъюгата антител к РНП с Alexa Fluor (532 нм) осуществляли по методике фирмы-изготовителя флуорохрома, описанной в инструкции. В пробирку, содержащую сухой бикарбонат натрия, добавляли 1 мл деионизованной воды для получения 1 М раствора и перемешивали содержимое пробирки. К специфическим антителам в виде раствора с концентрацией белка 1 мг/мл добавляли 0,1 объема полученного карбонатно-бикарбонатного буфера. Далее 100 мкл полученного белкового раствора переносили в пробирку с флуоресцентной меткой, плотно закрывали крышку пробирки и, плавно переворачивая пробирку, перемешивали ее содержимое до полного растворения красителя. После этого полученный раствор инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Во время инкубации каждые 10-15 мин пробирку также аккуратно переворачивали для повышения эффективности связывания антител с красителем. Очистку конъюгата от несвязавшегося красителя осуществляли с использованием спин-колонки с коммерческим носителем, входящим в набор для получения конъюгата, на центрифуге СМ-6 (Elmi, Латвия) в течение 3 мин при 1100 g.

2.2.5 Статистические методы обработки результатов исследований

Для статистической обработки результатов исследований использовали стандартные методы [6]. Расчет титра антител и инфицирующих доз ($\lg ID_{50}$ и $\lg LD_{50}$) вируса бешенства проводили по методу Рида и Менча [173]. Обработку

результатов, полученных при разработке СОП специфической активности АИГ, осуществляли в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [70]. Сравнение результатов, полученных при исследовании активности антирабических сывороток и иммуноглобулинов предлагаемым методом с применением культуры клеток и в реакции нейтрализации на белых мышах, осуществляли методом Блэнда-Алтмана [109] и методом вычисления коэффициента корреляции Пирсона [6,45].

Расчеты осуществляли с применением программы Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) и «Программы для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия, свидетельство о государственной регистрации № 2016617051).

ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА ШТАММА «МОСКВА 3253_{vero}» И КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ КОНЬЮГАТОВ

3.1 Выделение и физико-химические характеристики рибонуклеопротеина вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}»

Обнаружение вируса бешенства в культуре клеток с использованием иммунофлуоресценции связано с применением конъюгатов специфических антител с флуоресцентной меткой. Для конструирования подобных конъюгатов используют антитела, как к цельному вирусу бешенства, так и его структурным компонентам – гликопротеину и нуклеопротеину. Разрабатываемый способ контроля специфической активности антирабического иммуноглобулина основан на явлении иммунофлуоресценции и предполагает применение флуоресцирующего конъюгата. Согласно данным литературы, рибонуклеопротеин, как компонент диагностических препаратов, обладает такими необходимыми характеристиками, как стабильная аминокислотная последовательность, наличие специфической антигенной детерминанты, характерной для всех ВБ и ряда близкородственных вирусов [49]. Использование флуоресцирующих диагностических конъюгатов на основе антител к рибонуклеопротеину ВБ позволяет обеспечить высокую чувствительность при исследовании ВБ на клеточных культурах [23,115] вследствие накопления РНП в цитоплазме инфицированной клетки до начала сборки вирионов [135].

Выделение РНП непосредственно из вирусных частиц с сохранением его структурной целостности представляет особую сложность. При получении любого структурного компонента ВБ для дальнейшего применения следует помнить о необходимости сохранения целостности молекулы во избежание возникновения нарушений его функций. Эффективным методическим подходом представляется выделение РНП из цитоплазмы инфицированных ВБ клеток. Получение РНП вируса бешенства проводили по модифицированному методу М. Dastkhosh [126],

изложенному в разделе «Материалы и методы». Этот способ позволил получить субстанцию, содержащую РНП в концентрации от 0,01 до 0,2 мг/мл, из клеточной культуры, взятой в исходной концентрации 10^6 . Полученные растворы РНП хранили при минус 20 °С не более трех месяцев.

С целью обеспечения длительного хранения и возможности приготовления растворов с более высокой концентрацией полученный РНП подвергали лиофильному высушиванию на установке Alpha-I-5 в течение 8 ч. Лиофилизат РНП представлял собой пористую массу белого цвета, хорошо растворимую в воде и водных буферных растворах. Хранение высушенной субстанции РНП осуществляли при 4 °С.

Определение электрофоретической однородности РНП в растворе осуществляли с помощью электрофореза в 12 % ПААГ-ДСН. В исследование были взяты образцы РНП в растворе, не подвергавшиеся лиофильному высушиванию, и образцы РНП в восстановленном из лиофильно высушенной массы растворе. Результаты электрофореза свидетельствовали об отсутствии примесей в полученных образцах РНП (рисунок 1).

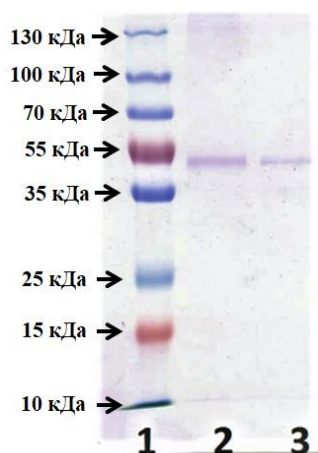


Рисунок 1. Электрофореграмма рибонуклеопротеина вируса бешенства:

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

Ориентировочная молекулярная масса исследуемых образцов составила около 55 кДа, что согласуется с литературными данными по молекулярной массе рибонуклеопротеина ВВ [49]. Лиофилизация не оказала повреждающего воздействия на структуру молекулы РНП: показатели его электрофоретической однородности и ориентировочное значение молекулярной массы остались неизменны. Полученную субстанцию использовали на следующих этапах исследования для иммунизации животных с целью получения антител к РНП вируса бешенства.

3.2 Экспериментальное обоснование применения питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина при культивировании инфицированных вирусом бешенства клеток

С целью получения максимального выхода рибонуклеопротеина из инфицированной клеточной культуры в настоящей части исследования проведен подбор оптимальных параметров культивирования клеток и вируса бешенства. Культивирование вируса осуществляли на клеточной культуре Vero с использованием коммерческой среды, а также экспериментальной среды на основе ФГФ крови лошадей. В качестве ростовой добавки использовали сыворотку крови крупного рогатого скота (КРС). Изучение возможности применения питательной среды на основе ФГФ связано с поиском потенциального способа снижения затрат на культивирование клеток и вируса, поскольку фибрин крови лошади представляет собой отход производства гетерологичного АИГ. Кроме того, использование ФГФ для конструирования питательной среды для перевиваемых клеточных культур и вируса бешенства способствует развитию малоотходных технологий в РосНИПЧИ «Микроб» [35].

Приготовление питательной среды на основе ФГФ проводили в несколько этапов. Фибрин, полученный при дефибринации иммунной плазмы крови лошадей-продуцентов АРС, измельчали, подвергали гидролизу с применением энзимов поджелудочной железы КРС и концентрировали с помощью

выпаривания и распылительного высушивания [34]. Полученный гидролизат фибрина представлял собой мелкодисперсный порошок нежно-желтого цвета с белковым запахом, обладал следующими характеристиками: содержание общего азота – $(7,5 \pm 0,3)$ %; содержание аминного азота – $(2,8 \pm 0,2)$ %; степень расщепления белка – $(50,7 \pm 1,68)$ %; содержание пептона (по шкале Дифко) – $(53,67 \pm 1,53)$ %; следы белка – отсутствуют; сухой остаток – $(10,7 \pm 0,2)$ %; хлориды – $(0,2 \pm 0,05)$ %; влажность – $(2,4 \pm 0,2)$ %; pH – $(6,7 \pm 0,2)$. Для приготовления культуральной среды сухой гидролизат фибрина растворяли в стерильном сбалансированном солевом растворе (Эрла или Хенкса) до концентрации 10 %, последовательно фильтровали с использованием мембранных фильтров с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм. Полученный раствор разбавляли соответствующим сбалансированным солевым раствором до конечной концентрации от 0,1 до 0,25 %. Показатель pH приводили к оптимальному значению $(7,2 \pm 0,2)$ при помощи раствора гидроксида натрия (0,1 моль/л) и ацетатного буферного раствора (pH 4,5; 0,1 моль/л). Питательная среда, полученная на основе ФГФ, представляла собой прозрачную жидкость красно-оранжевого или красного цвета без опалесценции и осадка.

Для установления оптимальной концентрации белковой основы готовили экспериментальные питательные среды, содержащие 0,05; 0,1, 0,25; 0,5 % ФГФ. Затем исследовали характер роста интактной монослойной культуры перевиваемой линий Vero на экспериментальных средах, в качестве образца сравнения использовали среду Игла MEM. Исходная клеточная концентрация составляла $(5 \pm 2) \times 10^4$ клеток на 1 мл питательной среды. Контроль образцов осуществляли на 3, 5 и 7 сут. Учет количества клеток осуществляли в камере Горяева, после чего вычисляли значение индекса пролиферации – отношение конечной концентрации клеток к исходной. Результаты исследований представлены в таблице 1. Значения индекса пролиферации, а также сроки образования и сохранения монослоя клеточной культуры Vero, выращенного на среде Игла MEM и на экспериментальных средах с содержанием 0,1 и 0,25 % белковой основы, были

Таблица 1 – Характеристика роста клеточной культуры Vero на питательных средах

Питательная среда + 10 % сыворотки КРС	Время культивирования, сут.	Индекс пролиферации (M±m)
Экспериментальная среда, содержащая 0,05 % основы ферментативного гидролизата фибрина	3	1,2±0,3
	5	4,6±0,4
	7	5,2±0,3
Экспериментальная среда, содержащая 0,10 % основы ферментативного гидролизата фибрина	3	7,3±0,3
	5	15,2±0,2
	7	18,2±0,4
Экспериментальная среда, содержащая 0,25 % основы ферментативного гидролизата фибрина	3	6,4±0,3
	5	14,8±0,3
	7	18,4±0,3
Экспериментальная среда, содержащая 0,50 % основы ферментативного гидролизата фибрина	3	3,6±0,2
	5	5,3±0,4
	7	12,4±0,3
Среда Игла MEM (образец сравнения)	3	6,8±0,4
	5	15,0±0,3
	7	17,0±0,4

сопоставимы. Клетки сохраняли характерную для данного вида форму с четко выраженными границами, признаков дегенерации не наблюдалось. Уменьшение содержания ФГФ до 0,05 % в составе питательной среды приводило к снижению индекса пролиферации и отсутствию формирования монослоя в течение срока наблюдения. При увеличении концентрации ФГФ до 0,5 % наблюдали медленный рост и изменение морфологии клеток. Для клеток Vero, выращенных в данных условиях, были характерны вытянутая форма и образование длинных отростков. На основании полученных результатов установлено, что использование среды на основе ФГФ, взятого в концентрации 0,1 и 0,25 %, для культивирования Vero не уступает по эффективности коммерческой среде Игла MEM.

Далее исследовали репродуктивную активность ВБ «Москва 3253_{Vero}» в клеточной культуре Vero, культивируемой на различных питательных средах. В опыте применяли экспериментальную среду на основе сухого ФГФ, взятого в концентрациях 0,1 и 0,25 %, с добавлением 2 и 5 % сыворотки КРС, а также питательную среду 199 с добавлением 5 % сыворотки КРС в качестве образца сравнения (таблица 2). Уровень накопления ВБ в питательной среде определяли в ИФА с использованием набора для диагностики бешенства. Результаты фиксировали с использованием спектрофотометра при 490 нм. Определение уровня накопления ВБ в цитоплазме клеток Vero проводили методом иммунофлуоресценции с использованием диагностического набора с меткой ФИТЦ. Полученные результаты свидетельствовали о сопоставимом уровне накопления ВБ для всех типов исследуемых питательных сред. Также была отмечена тенденция к накоплению внутриклеточного ВБ при культивировании на экспериментальных питательных средах.

Таблица 2 – 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
1	2	3	4
Экспериментальная среда, содержащая 0,10 % основы ферментативного гидролизата фибрина 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 ферментативного гидролизата фибрина 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 ферментативного гидролизата фибрина и 2 % сыворотки КРС	4	2,7±0,3	4,47±0,17
	7	4,3±0,4	4,9±0,14

1	2	3	4
Экспериментальная среда, содержащая 0,25 % основы ферментативного гидролизата фибрина 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.

Концентрация добавляемой в среду сыворотки КРС не оказала значительного влияния на вирусную репродукцию.

При дальнейшем культивировании вируса бешенства в клеточной культуре Vero с целью получения РНП использовали экспериментальные питательные среды на основе ФГФ с содержанием белковой основы 0,1 и 0,25 %, а также среды Игла MEM и 199 с добавлением 5 % сыворотки КРС. ВБ «Москва 3253_{Vero}» вносили в суспензию клеток в дозе 0,1 ID₅₀ на клетку. Начальная концентрация клеточной суспензии составляла от 0,8×10⁵ до 1,6×10⁵ клеток в 1 мл. Время культивирования составило до 5 сут. После каждых 24 ч культивирования из клеточной культуры выделяли РНП. На рисунке 2 представлена динамика выхода РНП в зависимости от используемой питательной среды. На графике указан выход РНП в мг относительно 10⁶ клеток. Результаты исследования показали более высокий выход РНП при культивировании ВБ на клетках Vero с применением питательных сред на основе сухого ФГФ, по сравнению с культивированием на средах 199 и Игла MEM. Оптимальным временем культивирования считали (72±4) ч, поскольку в этот период наблюдали максимальный выход РНП на экспериментальных питательных средах. Значительные отклонения от среднего времени культивирования приводили к изменению количества выделяемого РНП в сторону уменьшения.

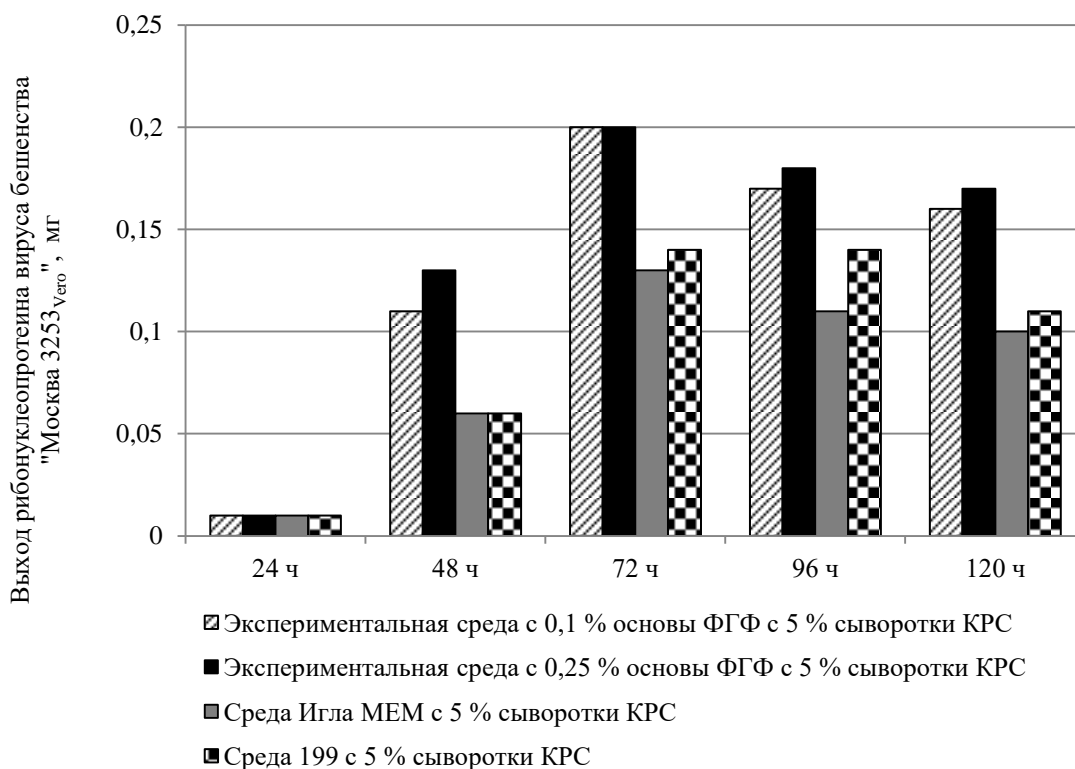


Рисунок 2. Динамика накопления рибонуклеопротеина вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» в культуре Vero в зависимости от питательной среды

Полученные экспериментальные данные позволили обосновать использование среды на основе сухого ФГФ с содержанием белковой основы от 0,1 до 0,25 % с целью культивирования вируса на клетках Vero и последующего выделения рибонуклеопротеина. При этом оптимальное время культивирования соответствует (72±4) ч при инфицирующей дозе 0,1 ID₅₀.

3.3 Выбор схемы иммунизации продуцентов для получения сывороток к рибонуклеопротеину вируса бешенства

Выбор вида животного-продуцента и иммунизационной схемы был основан на рекомендациях отечественных и зарубежных исследователей [88,115]. С целью получения сывороток с высоким содержанием антител к РНП исследовали возможность применения коллоидного золота и полиоксидония в качестве адьювантов.

Иммуноадъювантные свойства полиоксидония отмечены при его введении с антирабической вакциной. В результате показано увеличение выживаемости животных при их инфицировании [4]. Отмечено также положительное влияние полиоксидония на процесс антителообразования при условии введения кроликам совместно с инактивированным фиксированным вирусом бешенства [18]. Применение наночастиц золота с диаметром от 15 до 50 нм также усиливает ответ иммунной системы на введение противовирусных вакцин [104,131].

Исследование динамики образования антител проводили на трех группах животных, каждая из которых включала по 3 кролика. Первую группу иммунизировали раствором РНП без добавления адъювантов (дозировка – 400 мкг РНП), вторую и третью – с адъювантами: раствором наночастиц коллоидного золота размером от 14 до 17 нм (дозировка – 0,14 ммоль коллоидного золота, 400 мкг РНП) и полиоксидонием (дозировка – 1 мг полиоксидония, 400 мкг РНП). Материал для иммунизации готовили за 1 – 1,5 ч до использования, а затем вводили животным внутримышечно по 1 мл на 0, 43 и 57 день эксперимента. Для исследования динамики антителообразования на 43 и 57 день, а также в последний день эксперимента отбирали образцы крови из краевой вены уха. Срок наблюдения составил 70 дней. Титр антител к РНП в собранных сыворотках устанавливали в дот-иммуноанализе с применением антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота. Полученные результаты свидетельствовали об образовании антител к РНП у животных каждой из экспериментальных групп. Динамика антителообразования показана на рисунке 3.

Установлено наибольшее нарастание титра антител к РНП в сыворотках крови животных, иммунизированных РНП в сочетании с коллоидным золотом. К 43 дню исследования титр антител в сыворотках животных 2 группы составил 1:3200, что превышало показатели в сыворотках крови, полученных от животных 1 и 3 групп, в 4 и 2 раза соответственно. При завершении иммунизации осуществляли тотальный забор крови у экспериментальных животных.



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

Полученные от трех групп продуцентов сыворотки с антителами к РНП ВБ консервировали раствором хинозола и выдерживали при (6 ± 2) °С в течение месяца для стабилизации уровня антител. При этом наибольший титр антител к РНП вируса бешенства зафиксирован в образцах сывороток крови животных, иммунизированных РНП в сочетании с коллоидным золотом, значение которого составило 1:25600 (рисунок 4).

Данное обстоятельство позволило обосновать выбор схемы иммунизации с использованием РНП ВБ «Москва 3253_{Vero}» и наночастиц коллоидного золота в качестве адьюванта с целью дальнейшего получения сывороток с наибольшим титром антител к РНП ВБ и их последующего использования при конструировании диагностического флуоресцирующего конъюгата.

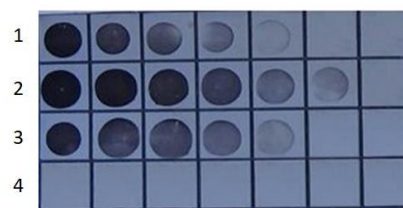


Рисунок 4. Уровень содержания антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства в сыворотках крови, полученных от продуцентов после завершения иммунизационных мероприятий (дот-иммуноанализ; двукратные разведения сывороток с 1:800):

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

3.4 Выделение антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства и получение флуоресцирующих конъюгатов

Сыворотки крови кроликов с наибольшим титром антител к РНП использовали для получения флуоресцирующего диагностикума, предназначенного для детекции вируса в клеточных культурах.

Антитела из полученных сывороток выделяли осаждением сульфатом аммония [93]. Удаление остатков солей осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, согласно методике, представленной в разделе 2.2.4. Концентрацию белка в очищенном растворе приводили к значению (22 ± 2) мг/мл, после чего исследовали активность антител в ДИА. Титр антител к РНП вируса бешенства составил от 1:16000 до 1:32000.

Очищенные антитела к РНП ВБ использовали для получения флуоресцирующих конъюгатов, предназначенных для обнаружения ВБ в клеточных культурах. В качестве флуоресцентных меток для конъюгатов использовали ФИТЦ, традиционно применяемый в РосНИПЧИ «Микроб» при изготовлении диагностических флуоресцирующих иммуноглобулинов, и Alexa Fluor (532 нм), отличающийся

высокой фотостабильностью. ФИТЦ-конъюгат готовили по стандартной методике [173], Alexa Fluor-конъюгат – согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Контроль конъюгирования антител с флуорохромами осуществляли в соответствии с методическим подходом [84], включающим определение спектрофотометрических характеристики антител, красителей и готовых конъюгатов. Результаты по исследованию соответствующих спектров поглощения показаны на рисунках 5 и 6.

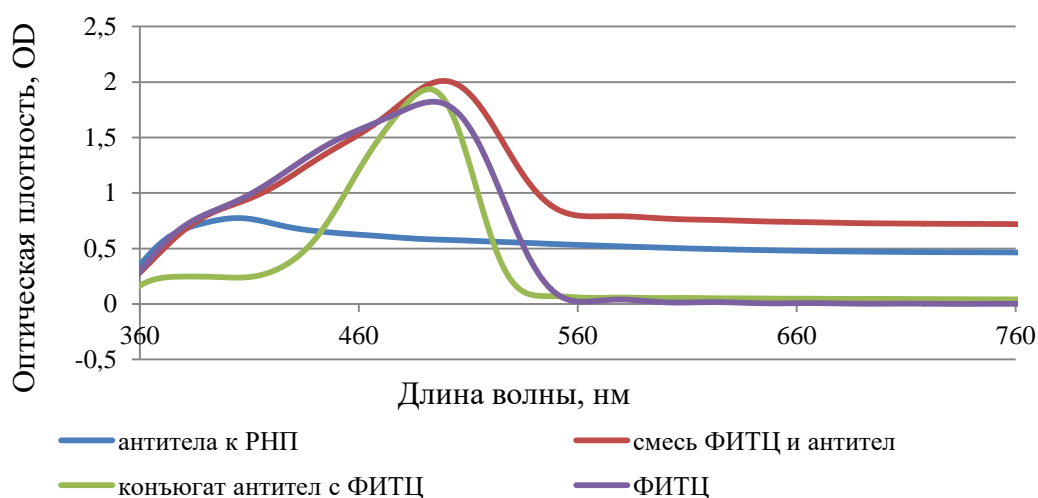


Рисунок 5. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с ФИТЦ

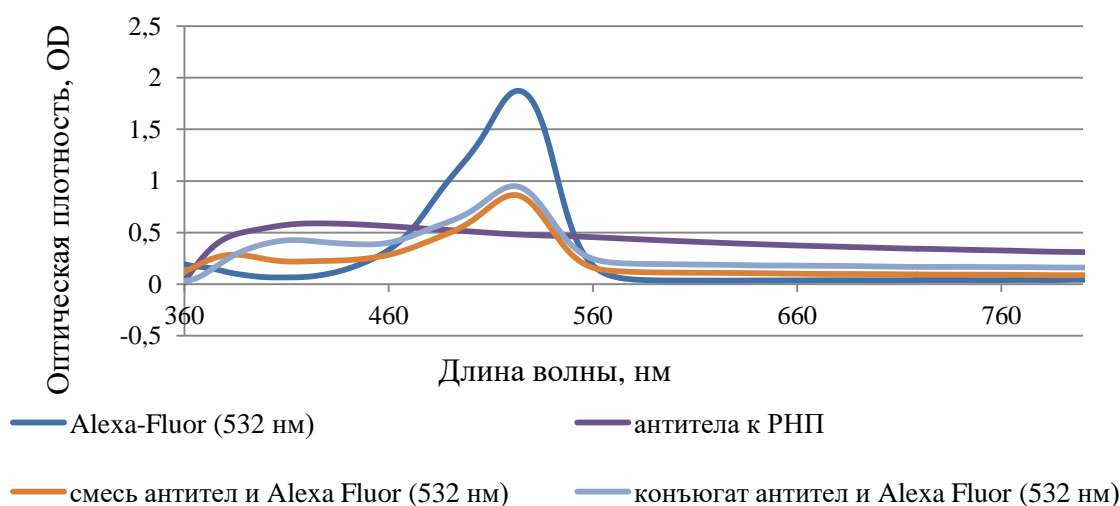


Рисунок 6. Исследование спектров поглощения при конъюгировании антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с Alexa Fluor (532 нм)

В ходе исследования установлено, что максимальное оптическое поглощение водных растворов ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм) находилось в области 495 и 522 нм соответственно. Пиковые значения спектров поглощения для растворов антител находились в диапазоне от 380 до 460 нм с постепенным снижением в длинноволновой области. При смешивании растворов флуорохромов с немечеными антителами получали результирующий спектр поглощения, равный сумме спектров поглощения смешиваемых компонентов, что указывало на отсутствие образования связей между ними в момент смешивания и отсутствие иных поглощающих компонентов в смеси. После конъюгации белка с флуорохромом спектральные характеристики выглядели иначе. Во-первых, конъюгаты имели два выраженных пика поглощения, соответствующих белку и связанному красителю. При этом пик, характерный для белковых веществ, находился в области поглощения 380-460 нм, но 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. Изменение оптической характеристики, выраженное в смещении максимума поглощения белкового компонента, связано с образованием нового соединения и свидетельствовало о конъюгации белка с флуорохромом.

Предел чувствительности полученных флуоресцирующих конъюгатов оценивали в сравнении с коммерческим ФИТЦ-конъюгатом антирабического иммуноглобулина. 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 °C). По истечении срока инкубации осуществляли окрашивание клеточной культуры экспериментальными и коммерческим флуоресцирующими конъюгатами в течение 1 ч при 37 °C. Экспериментальные конъюгаты с ФИТЦ готовили в серийных двукратных разведениях от 1:10 до 1:160, с Alexa Fluor (532 нм) – в серийных пятикратных разведениях от

1:10 до 1:1250. Коммерческий 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. При этом свечение инфицированных клеток оценивали не менее чем на 3 балла, так же как и при окрашивании коммерческим конъюгатом в разведении 1:40 (рисунок 7). При увеличении степени разведения раствора конъюгата свечение инфицированных клеток становилось менее заметным и оценивалось на 1 или 2 балла.

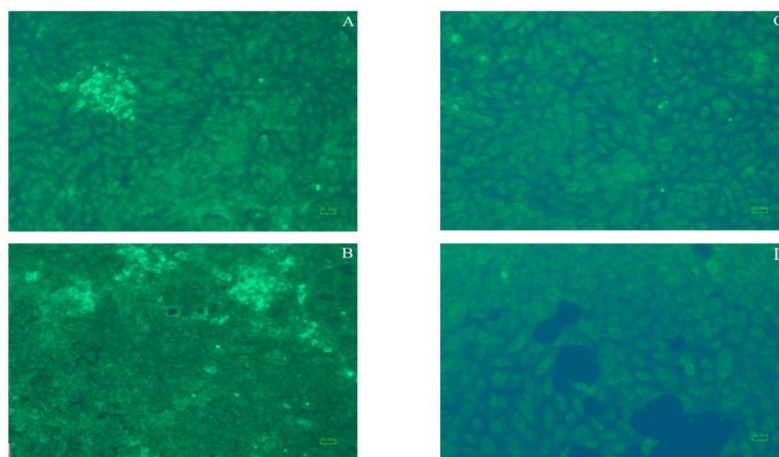


Рисунок 7. Сравнение эффективности коммерческого и экспериментального антирабических ФИТЦ-конъюгатов в образцах клеточной культуры Vero, увеличение (200x): А – инфицированная *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» клеточная культура Vero, окрашенная коммерческим ФИТЦ-конъюгатом (1:40); В – инфицированная *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)

При визуальной оценке эффективности конъюгата антител с Alexa Fluor (532 нм) специфическое свечение образцов, содержащих вирус бешенства, с ин-

тенсивностью не менее чем на 3 балла отмечено при его разведении не более чем 1:250 (рисунок 8). При увеличении степени разведения раствора конъюгата окрашивание образцов проходило с меньшей эффективностью.

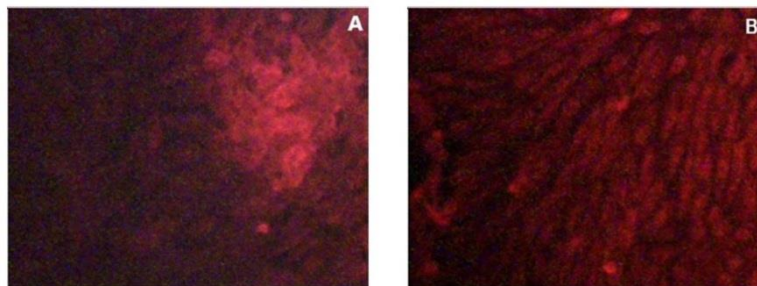


Рисунок 8. Образцы инфицированной *virus fixe* «Москва 3253_{Vero}» клеточной культуры Vero, окрашенные конъюгатом антирабических антител с Alexa Fluor (532 нм), увеличение (100x): А – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:250); В – окрашенный Alexa Fluor-конъюгатом (532 нм) образец (1:1250).

Заключение по главе 3

Результатом данной главы исследования явилась разработка экспериментальной схемы получения флуоресцирующих конъюгатов на основе РНП ВБ штамма «Москва 3253_{Vero}», включающей культивирование вируса в клеточной культуре Vero с использованием питательной среды на основе ФГФ, выделение РНП ВБ из инфицированной клеточной культуры, иммунизацию животных-продуцентов РНП, выделение антител к РНП ВБ и их конъюгацию с флуоресцентными метками. В настоящем исследовании впервые предложено применение питательной среды на основе ФГФ крови лошадей для культивирования клеток Vero, инфицированных вирусом бешенства, с целью выделения РНП. Такой подход является потенциальным способом утилизации отходов производства АИГ и удешевления процессов культивирования клеточных линий и вируса бешенства. Применение экспериментальной питательной среды позволило получить из 10^6 клеток Vero через 72 ч после их инфицирования 0,2 мг РНП против 0,14 и 0,13 мг, полученных в аналогичных условиях с применением среды 199 и Игла MEM

соответственно. Особенностью получения РНП ВБ является выделение нативного рибонуклеопротеина из инфицированной клеточной культуры и его лиофильное высушивание.

В ходе исследований была выявлена наиболее эффективная схема иммунизации продуцентов, заключающаяся во внутримышечном введении кроликам РНП с наночастицами коллоидного золота в качестве адьюванта на 0, 43 и 57 дни иммунизационных мероприятий. Данная схема позволила получить сыворотки с титром антител к РНП 1:25600, превышающим в 2 раза значения титров антител в сыворотках от продуцентов, иммунизированных РНП без адьюванта и РНП с полиоксидонием в качестве адьюванта. Выделенные антитела использовали при получении конъюгатов с флуоресцирующими красителями – ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм), предел чувствительности которых составил 1:80 и 1:250 соответственно. Дальнейшее исследование по разработке метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур проводили с использованием коммерческого и полученных экспериментальных флуоресцирующих антирабических конъюгатов, взятых в установленных рабочих разведениях.

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА И АНТИРАБИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

4.1 Экспериментальное обоснование возможности применения клеточных культур Vero и ВНК-21 для выявления вируса бешенства

В классических тестах *in vitro* для определения титра антител к вирусу бешенства (FAVN-test, RFFIT) применяют клеточную линию ВНК-21 и штамм вируса бешенства CVS-11. Литературные источники указывают на возможность успешного использования в аналогичных тестах *in vitro* иных клеточных культур и штаммов вируса бешенства [8,95,106]. В настоящем исследовании для разработки методического приема определения уровня антител к вирусу бешенства выбран вирус бешенства «Москва 3253_{Vero}», адаптированный к клеточной культуре [3]. Геномный анализ данного штамма показал наличие большого числа единичных мутаций, приобретенных вирусом в ходе адаптации к росту на перевиваемой культуре Vero, и подтвердил его филогенетическую близость к разнообразным вакцинным штаммам ВБ [43].

Задача, решенная в настоящем разделе, состояла в установлении оптимальных параметров определения антигена вируса бешенства, накапливаемого в клеточной культуре, и антирабических антител. Одним из этих параметров является клеточная культура, приемлемая для выявления применяемого вируса. В эксперименте использовали две клеточные линии – Vero и ВНК-21. Выбор клеток Vero обоснован тем, что данная линия является субстратом, на котором происходила адаптация исходного штамма ВБ «Москва 3253». Клеточная культура ВНК-21 представлена во многих официальных документах для использования в тестах по определению антирабических антител [149,173,193]. При определении антигена ВБ, помимо выбора вида клеточной культуры, имеет значение выбор питательной среды, а также оптимальное время культивирования вируса.

Для установления наиболее подходящей для детекции вируса бешенства клеточной культуры, оптимального состава питательной среды и времени культивирования вируса, титровали вирусосодержащую жидкость 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 клеточной культуры Vero или ВНК-21 соответственно в концентрации $(3\pm 1)\times 10^5$ клеток/мл. Для поддержания жизнедеятельности клеток использовали среду Игла MEM с содержанием сыворотки КРС от 2 до 10 %. Затем планшеты с клетками и вирусом выдерживали в CO_2 -инкубаторе в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С. Инкубационный период составлял 24, 48 и 72 ч. В указанные сроки исследовали клеточную культуру на наличие вируса методом иммунофлуоресценции. После завершения инкубации клеточный монослой фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 80 % водным раствором ацетона, предварительно охлажденным до минус 20 °С [173]. Фиксированный монослой окрашивали конъюгатом антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ. Результаты исследований представлены на рисунках 9 и 10.

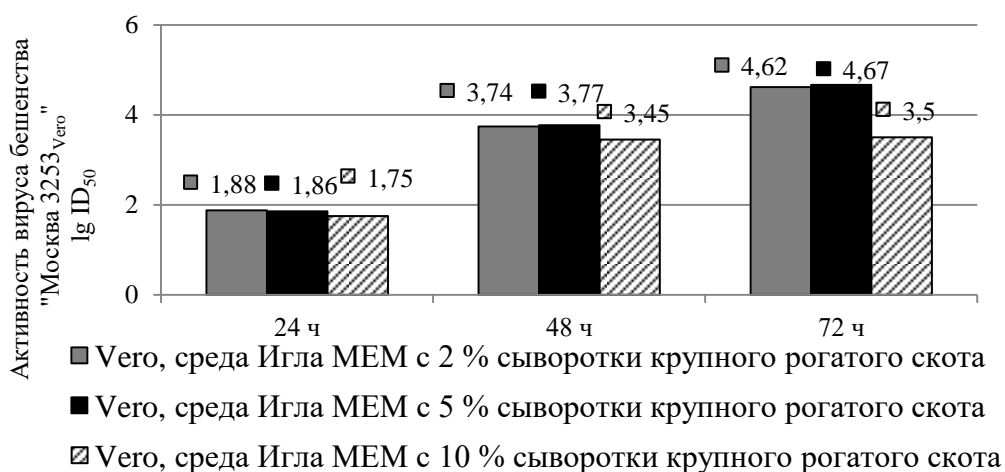


Рисунок 9. Определение активности вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточной культуре Vero

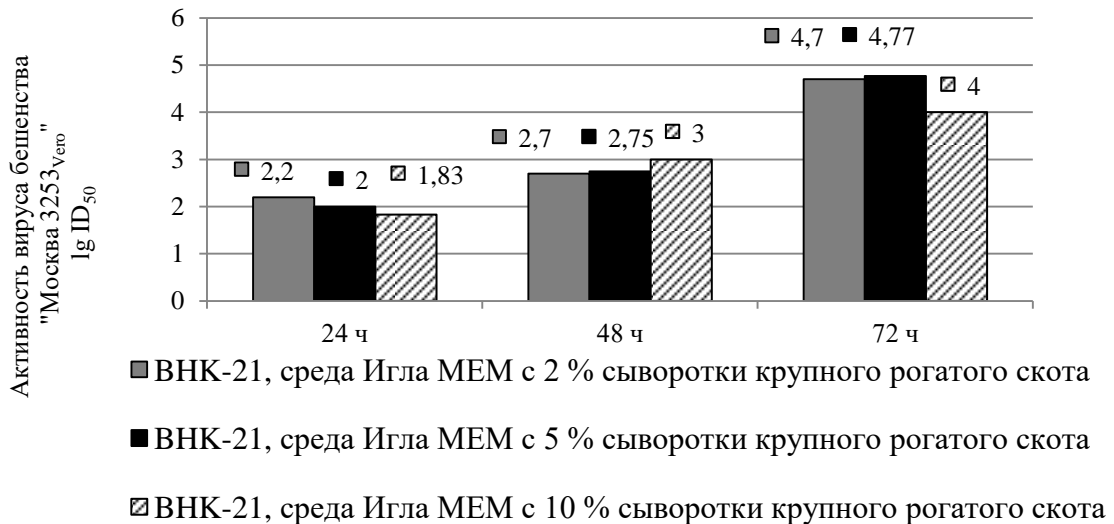


Рисунок 10. Определение активности вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточной культуре ВНК-21

При инкубировании указанных клеточных культур в течение 24 ч обнаруживали слабосветящиеся фокусы специфической флуоресценции, визуально оцененные на 1 и 2 балла в разведениях вируса 10^{-2} ; при инкубировании в течение 48 ч наблюдали фокусы специфической флуоресценции, визуально оцененные на 2 и 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 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 и 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 культурой ВНК-21, инкубируемых в течение 72 ч, 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 клеточной культуры ВНК-21, инкубируемой в течение 48 ч и 72 ч, характерна следующая особенность: фокусы флуоресценции,

обнаруживаемые на клеточной культуре, как правило, состояли из малочисленных групп или единичных инфицированных клеток, достаточно удаленных друг от друга. Данное обстоятельство затрудняло учет результатов иммунофлуоресценции. При исследовании инфицированной ВБ клеточной культуры Vero, напротив, выявляли крупные и многочисленные фокусы флуоресценции.

Результаты экспериментов, полученные в ходе исследования особенностей культивирования вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточных культурах Vero и ВНК-21, подтвердили наличие возможности использования данных клеточных культур с целью детекции вируса с применением люминесцентной микроскопии. Установлено, что оптимальное содержание сыворотки КРС в питательной среде для культивирования ВБ составляет от 2 до 5 %, поскольку при добавлении в среду 10 % сыворотки КРС было отмечено снижение значения активности ВБ.

На основании результатов исследования был установлен оптимальный срок инкубации инфицированной ВБ клеточной культуры соответствующий 48 ч для ВНК-21 и 72 ч для культуры Vero. Анализ особенностей поражения вирусом бешенства исследуемых клеточных культур показал, что выбор в пользу культуры Vero с целью ее дальнейшего применения в реакции нейтрализации ВБ *in vitro* является предпочтительным. При проведении дальнейших исследований по разработке метода контроля уровня ВНА *in vitro* применяли клеточную культуру Vero и питательную среду Игла MEM с добавлением 5 % сыворотки КРС, учет результатов исследования осуществляли через 72 ч от начала инкубации в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и 37 °С.

4.2 Определение условий фиксации инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры и окрашивания флуорохромными конъюгатами

Одной из задач данного исследования было изучение влияния типа фиксирующего вещества и времени фиксации на структуру клеточного монослоя и значение активности ВБ. Существующие в настоящее время протоколы исследования вируса бешенства в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции предполагают предварительную фиксацию клеточных куль-

тур охлажденным 80 % водным раствором ацетона с последующим окрашиванием конъюгатом антирабических антител с ФИТЦ в течение 1 ч [173,193]. Также в литературе встречаются рекомендации по применению раствора формальдегида для фиксации клеточных культур [173].

При определении антигена ВБ на клеточной культуре важна не только процедура фиксации клеточного монослоя, но и способ дальнейшего окрашивания зафиксированных образцов. В данном исследовании для обнаружения вируса бешенства предлагается использование как коммерческого, так 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 96-луночного 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 осуществляли окрашивание монослоя конъюгатами антител с флуорохромами, взятыми в рабочих разведениях, в течение часа. После окрашивания оценивали титр вируса и состояние монослоя. Результаты исследования представлены на рисунках 11 и 12. Исследование показало, что применение 80 % раствора ацетона и 4 % раствора формальдегида с целью фиксации инфицированного ВБ монослоя клеток Vero позволяет получать сопоставимые результаты. При фиксации в течение 3 мин наблюдали открепление большей части клеточного монослоя в образцах при использовании обоих типов фиксирующих веществ. Наибольшая активность ВБ была зарегистрирована при фиксации клеток в течение 10 мин как ацетоном, так и формальдегидом. Максимальное значение активности ВБ отмечено в образцах, фиксированных 4 % раствором формальдегида и окрашенных конъюгатом антител к РНП ВБ с ФИТЦ (1:80) в течение 10 мин.

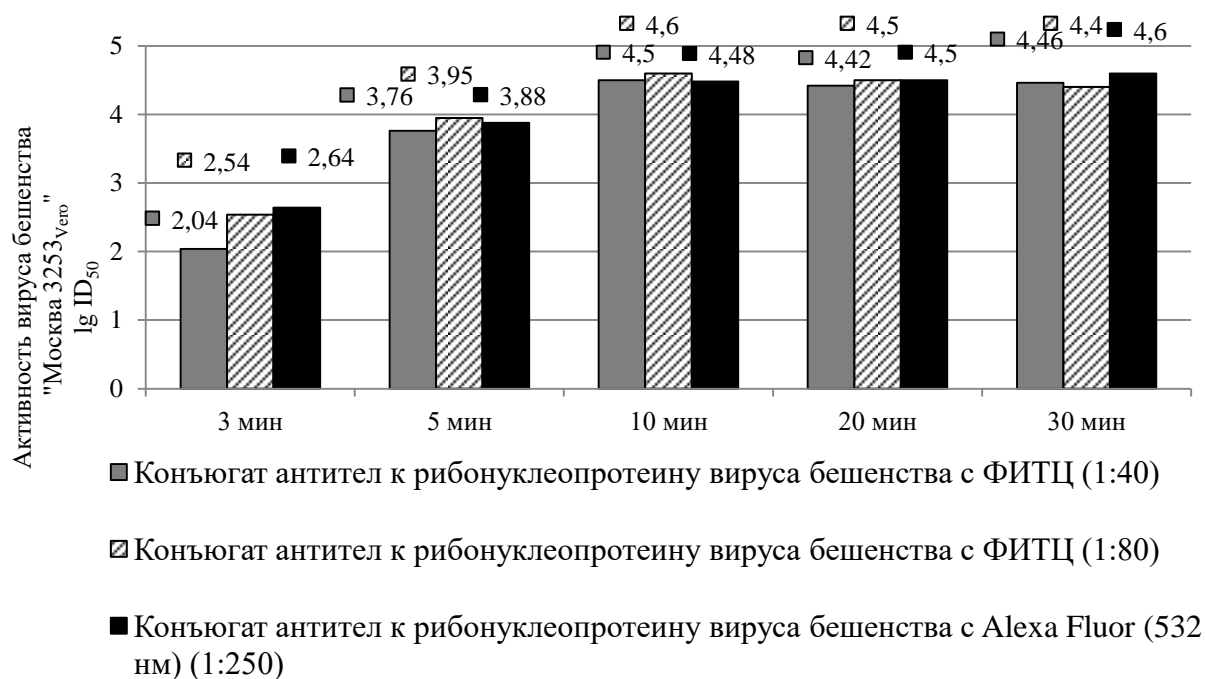


Рисунок 11. Определение активности вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточной культуре Vero, фиксированной 80 % раствором ацетона при (23±3) °С

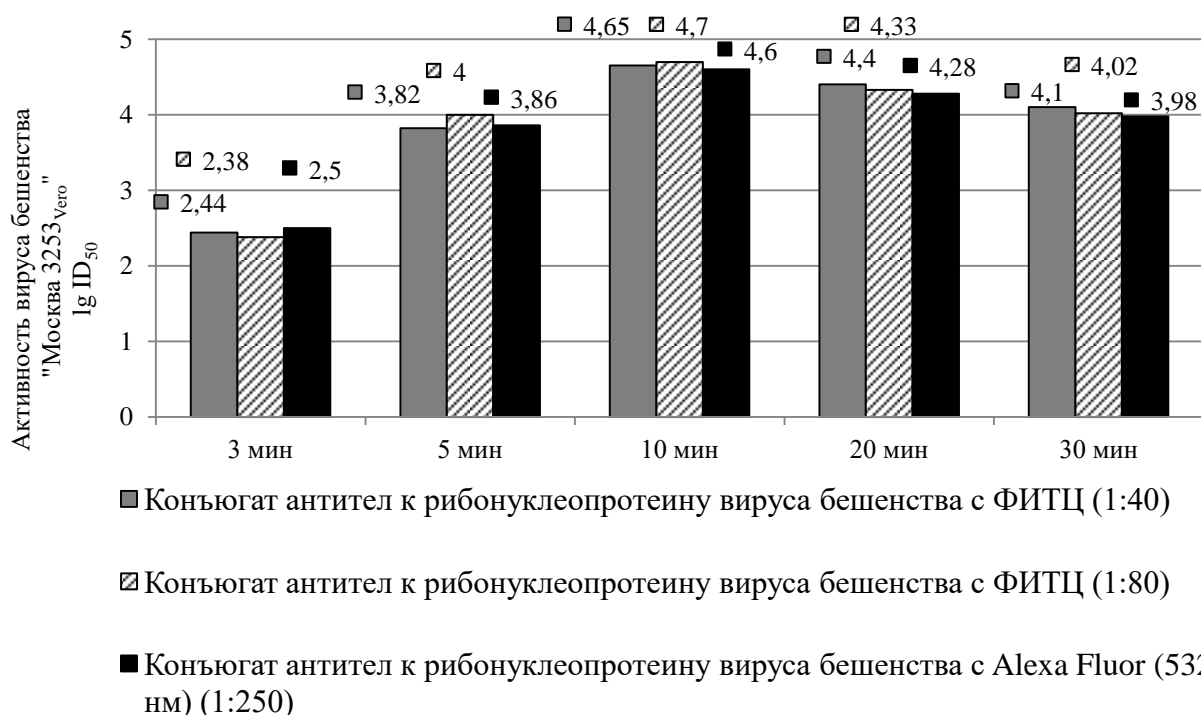


Рисунок 12. Определение активности вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточной культуре Vero, фиксированной 4 % раствором формальдегида при (23±3) °С

При увеличении времени фиксации с 10 до 30 мин отмечали снижение интенсивности флуоресценции в образцах при использовании формальдегида, что согласуется с литературными данными [173].

Результаты исследования, полученные при проведении фиксации в температурных условиях (23 ± 3) °С оказались сопоставимы с результатами эксперимента, проведенного при (6 ± 2) °С. При исследовании влияния используемых фиксирующих веществ на интактную клеточную культуру, отмечали отсутствие визуально обнаруживаемых нарушений целостности клеточного монослоя.

На следующем этапе осуществляли эксперименты по установлению оптимального времени окрашивания в отношении коммерческого и полученных ранее экспериментальных конъюгатов антирабических антител с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Окраску препаратов проводили от 0,5 до 1,5 ч, качество окрашивания исследовали с интервалом времени 10 мин. В период от 40 до 70 мин при использовании обоих типов конъюгатов в опытных образцах наблюдали ярко выраженные фокусы флуоресценции, оцениваемые на 3 и 4 балла. В образцах, окрашиваемых в течение 50-70 мин, отмечали большее количество фокусов 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 всей поверхности монослоя, препятствующее достоверному определению локализации фокусов флуоресценции.

По итогам исследования было установлено оптимальное время фиксации клеточного монослоя 80 % раствором ацетона или 4 % раствором формальдегида, соответствующее (15 ± 5) мин. Оптимальное время окрашивания образцов экспериментальными диагностическими конъюгатами антител к РНП ВБ с ФИТЦ или Alexa Fluor (532 нм) составило (60 ± 10) мин.

4.3 Определение оптимальной рабочей дозы вируса для постановки реакции нейтрализации *in vitro*

С целью дальнейшего использования вируса бешенства для определения вируснейтрализующей активности препарата антирабического иммуноглобулина и антирабических сывороток методом *in vitro*, проводили определение оптимальной рабочей дозы вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» на клеточной культуре Vero. Для исследования выбраны следующие инфицирующие дозы: 50, 100, 300, 500, 1000, 5000 ID₅₀/0,05 мл. Определение рабочей дозы проводили с применением Европейского стандартного образца антирабического иммуноглобулина (активность 91 МЕ/мл).

Для постановки эксперимента было подготовлено 3 культуральных 96-луночных планшета – по одному на исследование двух вариантов рабочих доз вируса. В лунках планшета готовили трехкратные разведения Европейского СО АИГ на среде Игла MEM с добавлением 5 % сыворотки КРС, начиная с разведения 1:50. Каждое разведение было представлено в 8 повторностях. За отрицательный контроль принимали монослой Vero с добавлением нормальной лошадиной сыворотки. 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 антирабического иммуноглобулина составляли 3,38; 3,23; 2,6; 2,3 lg ED₅₀ соответственно. При использовании ВБ в дозе 5000 ID₅₀/0,05 мл антирабические антитела обнаруживали в титре менее 2 lg ED₅₀, что заметно снижало чувствительность метода. При использовании дозы ВБ 50 ID₅₀/0,05 мл не удалось установить конечную точку титрования стандартного образца антирабического иммуноглобулина. На основании полученных результатов установлено, что оптимальная доза ВБ для определения антирабических антител в реакции вируснейтрализации *in vitro*, находится в интервале 100-300 ID₅₀/0,05 мл.

4.4 Определение оптимального периода нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре

В предыдущих экспериментах нейтрализацию вируса бешенства антирабическими антителами при определении активности АРС и АИГ на клеточной культуре осуществляли в течение 1 ч согласно протоколам проведения FAVN-теста. Использование штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» в предлагаемом методе предполагает обоснование интервала времени, необходимого для нейтрализации данного штамма вируса антирабическими антителами.

Для установления оптимального значения периода нейтрализации Европейский стандартный образец АИГ титровали в 96-луночных планшетах. Затем в каждую лунку вносили по 50 мкл рабочего разведения ВБ и инкубировали планшеты в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение различных интервалов времени: 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин. По завершении соответствующих периодов нейтрализации добавляли клеточную культуру Vero, инкубировали планшеты в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе, а затем исследовали с применением метода люминесцентной микроскопии (рисунок 13).

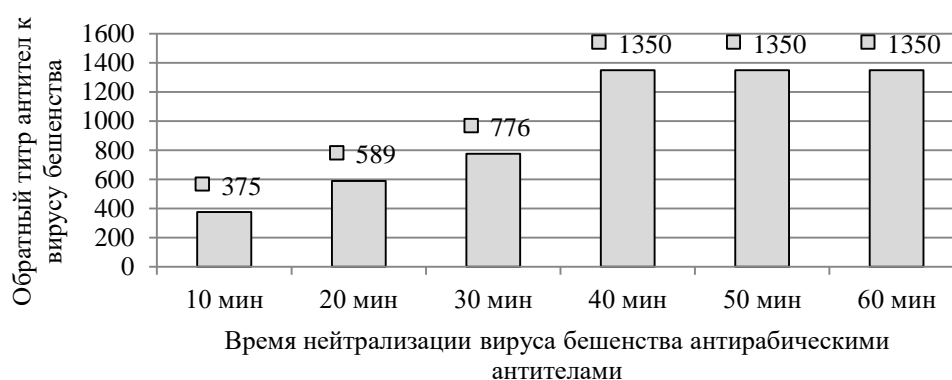


Рисунок 13. Динамика нейтрализации вируса бешенства антирабическими антителами

Результаты эксперимента свидетельствовали о появлении фокусов флуоресценции в лунках с разведением 1:375 стандартного образца антирабического иммуноглобулина при нейтрализации в течение 10 мин. С увеличением времени

нейтрализации наблюдали 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 влияющее на результат РН *in vitro*, составило 40 мин.

Заключение по главе 4

По итогам проведенных исследований были установлены оптимальные значения параметров разрабатываемого метода контроля содержания антирабических антител *in vitro*, которые использовали в дальнейших экспериментах. Определение показателя специфической активности образцов АРС и готового препарата АИГ методом *in vitro* проводили с использованием культуры клеток Vero, питательной среды Игла МЕМ с добавлением 5 % сыворотки КРС, ВБ «Москва 3253_{Vero}» в рабочей дозе 100-300 ID₅₀/0,05 мл. В качестве фиксатора применяли 80 % водный раствор ацетона или 4 % раствор формальдегида в течение (15±5) мин. Окрашивание образцов коммерческим или экспериментально полученными диагностическими конъюгатами осуществляли в течение (60±10) мин. Нейтрализацию ВБ специфическими антителами в лунках микропланшета осуществляли не менее 40 мин, учет результатов реакции методом люминесцентной микроскопии проводили через 72 ч от начала инкубации в условиях CO₂-инкубатора (5 % CO₂ и 37 °C).

ГЛАВА 5 ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА

5.1 Разработка и аттестация стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в тесте *in vitro*

Применение метода определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина *in vitro* с применением перевиваемой культуры Vero и ВБ «Москва 3253_{Vero}» предполагает наличие соответствующего стандартного образца для осуществления контроля получаемых результатов. Поскольку для выполнения рутинных исследований ВОЗ рекомендует применение стандартных образцов предприятия, то при разработке метода *in vitro* возникла необходимость в получении соответствующего СОП. Кандидатом в стандартные образцы предприятия стал иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади серии 174, полученный в соответствии с требованиями ПР № 01898109-56-19 на производство антирабического иммуноглобулина. Аттестацию кандидата проводили в соответствии с нормативными документами Р N 002639/01–250210, изм. № 1-5, разделом «Специфическая активность» и методическими приемами, обоснованными в ходе исследований в рамках главы 4. Значение показателя специфической активности кандидата в СОП определяли в реакции нейтрализации вируса на клеточной культуре. В качестве образца сравнения использовали антирабический иммуноглобулин, соответствующий требованиям Европейской Фармакопеи, для применения в исследованиях *in vitro* (Human rabies immunoglobulin BRP batch 1).

Для исследования выбрали три образца кандидата в СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина. Опытные и контрольный образцы

антирабического иммуноглобулина разводили в питательной среде и титровали в 96-луночном культуральном планшете, начиная с разведения 1:50 с двукратным или трехкратным шагом. Далее в каждую лунку добавляли по 50 мкл рабочего разведения вируса, содержащего от 100 до 300 ID₅₀/0,05 мл, после чего планшеты убирали в CO₂-инкубатор на 40 мин. После к содержимому каждой лунки добавляли по 0,05 мл суспензии клеток Vero в концентрации $(3 \pm 1) \times 10^5$ клеток/мл. Каждое разведение исследовали не менее чем в четырех повторностях. Планшеты с клетками инкубировали в условиях CO₂-инкубатора в течение 72 ч. После фиксации и окрашивания клеточного монослоя флуоресцирующим диагностическим конъюгатом проводили учет результатов с использованием инвертируемого люминесцентного микроскопа при увеличении от 100 до 200 крат. Анализ результатов и расчет титра иммуноглобулина проводили по методу Рида и Менча. Обработку полученных результатов осуществляли в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» [70] (таблица 3).

По результатам исследования было установлено значение специфической активности для кандидата в СОП активности антирабического иммуноглобулина, составившее $(180,8 \pm 18,8)$ МЕ/мл. Определение стабильности разработанного СОП по показателю «специфическая активность» в течение и конце срока годности (1,5 года), а также через 1 месяц после истечения срока годности отображены в таблице 4. Значение аттестованной характеристики СОП оставалось в пределах установленного при аттестации интервала, что подтверждает стабильность разработанного СОП в течение срока годности. Разработанный стандартный образец предприятия специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток (сер. 41-01-20) утвержден и внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Таблица 3 – 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 ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$)
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	

Таблица 4 – Результаты испытаний стабильности СОП специфической активности антирабического иммуноглобулина в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero

Аттестованная характеристика СОП	Значение аттестованной характеристики СОП			
	На момент выпуска	Через 9 мес.	Через 18 мес.	Через 19 мес.
Специфическая активность в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero, МЕ/мл	180,8±18,8	181,6±30,5	173,7±21,8	174,3±13,3

Указанный СОП применяли в дальнейших экспериментах по исследованию специфической активности АИГ в качестве образца сравнения.

5.2 Сравнительный анализ результатов исследования специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методами *in vivo* и *in vitro*

С учетом вышеописанных оптимальных для постановки РН *in vitro* параметров, проведено определение показателя специфической активности для опытных образцов АРС и АИГ в реакции нейтрализации на клеточной культуре Vero. При постановке РН на клеточной культуре для исследования четырех опытных образцов использовали один 96-луночный микропланшет, разделенный на 4 равных сектора (рисунок 14, А). Представленная схема расположения образцов обеспечивает исследование одного опытного образца в четырех повторностях. Сыворотки крови перед началом эксперимента инкубировали на водяной бане при 56 °С для инактивации системы комплемента. Исследуемые образцы представляли собой трехкратные последовательные разведения. В полученные разведения добавляли вирус бешенства «Москва 3253_{Vero}» в рабочей дозе. По истечении периода нейтрализации в каждую лунку добавляли клетки Vero в рабочей концентрации и инкубировали планшеты в СО₂-инкубаторе в течение 72 ч. Также для каждого эксперимента готовили один планшет с контрольными образцами. Схема расположения образцов контрольного планшета представлена на рисунке 14, В.

В секторе 1 планшета В готовили трехкратные разведения стандартного образца (Европейский стандартный образец антирабического иммуноглобулина; СОП специфической активности АИГ для применения в РН на клеточной культуре), начиная с 1:50. Далее в лунки вносили по 50 мкл ВБ в рабочей дозе, по истечении периода нейтрализации добавляли клетки Vero в рабочей концентрации и инкубировали планшеты в течение 72 ч в условиях СО₂-инкубатора. Образовавшийся в лунках планшетов с контрольными и опытными образцами клеточный монослой фиксировали и окрашивали флуоресцирующими антирабическими антителами. Итоги РН учитывали при помощи инвертированного люминесцентного микроскопа.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	образец 1						образец 2					
B												
C												
D												
E	образец 3						образец 4					
F												
G												
H												

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1				2				4			
B									5			
C												
D												
E												
F					3							
G												
H												

B

Рисунок 14. А – области титрования опытных образцов (1-4) на культуральном 96-луночном планшете; В – области титрования контрольных образцов на культуральном 96-луночном планшете: 1 – Стандартный образец антирабического иммуноглобулина (трехкратные разведения с 1:50); 2 – интактная культура Vero; 3 – нормальная лошадиная сыворотка 2 %; 4 – рабочее разведение вируса «Москва 3253_{Vero}»; 5 – вирус бешенства «Москва 3253_{Vero}» (четырекратные разведения с 1:100)

Расчет титра антител в образцах осуществляли по методу Рида и Менча. Исследованные в РН *in vitro* опытные образцы также были испытаны в РН на белых мышах. Определение титра антирабических антител проводили по методу Рида и Менча. При постановке РН *in vivo* в качестве образца сравнения использовали СОП специфической активности иммуноглобулина антирабического для применения в РН на белых мышах с активностью 190 МЕ/мл. Результаты РН *in vivo* и *in vitro* представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Специфическая активность антирабических сывороток и иммуноглобулина в реакции нейтрализации *in vivo* и *in vitro*

	Титр антител (активность, МЕ/мл)							
	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
№ образца АИГ/АРС	РН № 1	РН № 2	РН № 3	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)	РН № 1	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)	РН № 2	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)
№ образца АИГ	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1:4032 (192)	1:3894 (186)	1:3810 (182)	1:1908 (91)	1:3784 (180)	1:4000 (190)	1:3440 (182)	1:3600 (190)
2	1:3592 (171)	1:4677 (223)	1:3810 (182)		1:4362 (207)		1:4000 (211)	
3	1:4525 (216)	1:4076 (194)	1:4085 (195)		1:4000 (171)	1:4450 (190)	1:2000 (190)	1:2000 (190)
4	1:3200 (153)	1:3243 (155)	1:3394 (162)		1:3714 (159)		1:1900 (180)	
5	1:2347 (188)	1:2700 (216)	1:2400 (192)	1:2263 (181)	1:5112 (204)	1:4758 (190)	1:1573 (191)	1:1565 (190)
6	1:2263 (181)	1:2091 (167)	1:2138 (171)		1:4525 (181)		1:1364 (166)	
7	1:1880 (150)	1:2248 (180)	1:1905 (152)		1:1763 (167)	1:2000 (190)	1:3281 (156)	1:4000 (190)
8	1:1903 (152)	1:1872 (150)	1:2043 (163)		1:1621 (154)		1:4000 (190)	

	Титр антител (активность, МЕ/мл)							
	<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
№ образца АИГ/АРС	РН № 1	РН № 2	РН № 3	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)	РН № 1	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)	РН № 2	Стандартный образец АИГ (МЕ/мл)
№ образца АРС	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1:810 (37)	1:492 (22)	1:562 (25)	1:2016 (91)	1:673 (23)	1:5657 (190)	1:153 (14)	1:2150 (190)
2	1:627 (28)	1:627 (28)	1:389 (18)		1:596 (20)		1:200 (18)	
3	1:324 (15)	1:349 (16)	1:209 (9)		1:164 (7)	1:4478 (190)	1:100 (11)	1:1760 (190)
4	1:270 (12)	1:156 (7)	1:187 (8)		1:121 (5)		1:109 (12)	
5	1:627 (42)	1:349 (23)	1:810 (54)	1:2724 (181)	1:424 (17)	1:4742 (190)	1:860 (30)	1:5421 (190)
6	1:1403 (93)	1:973 (65)	1:1066 (71)		1:1131 (45)		1:1415 (50)	
7	1:810 (54)	1:562 (37)	1:810 (54)		1:1080 (39)	1:5263 (190)	1:971 (43)	1:4299 (190)
8	1:674 (45)	1:810 (54)	1:627 (42)		1:743 (27)		1:800 (35)	

Примечание: определение титра специфических антирабических антител в образцах осуществляли при помощи антирабических флуоресцирующих конъюгатов, взятых в рабочих разведениях: коммерческого антирабического ФИТЦ-конъюгата (1:40) – в реакции нейтрализации *in vitro* № 1; экспериментального ФИТЦ-конъюгата (1:80) – в реакции нейтрализации *in vitro* № 2; экспериментального Alexa Fluor-конъюгата (532 нм) (1:250) – в реакции нейтрализации *in vitro* № 3.

Сравнительный анализ полученных результатов, представленный на рисунке 15, показал наличие сильной корреляции ($r > 0,9$) между результатами данных тестов при уровне значимости $> 95\%$ [45].

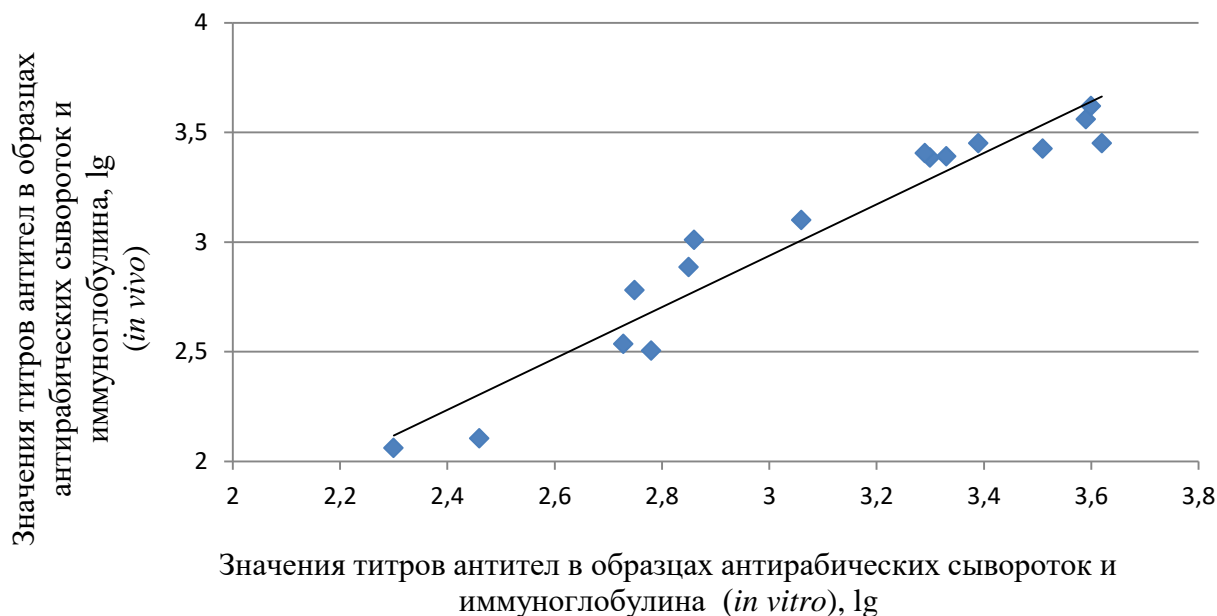


Рисунок 15. Корреляция между значениями титров антител, полученных при исследовании образцов антирабических сывороток и иммуноглобулина в реакции нейтрализации на белых мышках (*in vivo*) и реакции нейтрализации на клеточной культуре Vero (*in vitro*)

Для оценки согласованности данных по активности образцов АРС и АИГ, 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 специфической активности антирабического иммуноглобулина и антирабических сывороток показаны на рисунках 16 и 17.

Анализ диаграмм показал, что 93,75 % значений разницы показателей при парных измерениях попадают в доверительный интервал $((\pm 1,96) \times SD)$. При исследовании активности АИГ средняя разность между измерениями составила 0,0425, а при исследовании сывороток – минус 0,12, что невелико в сравнении со значениями специфической активности.

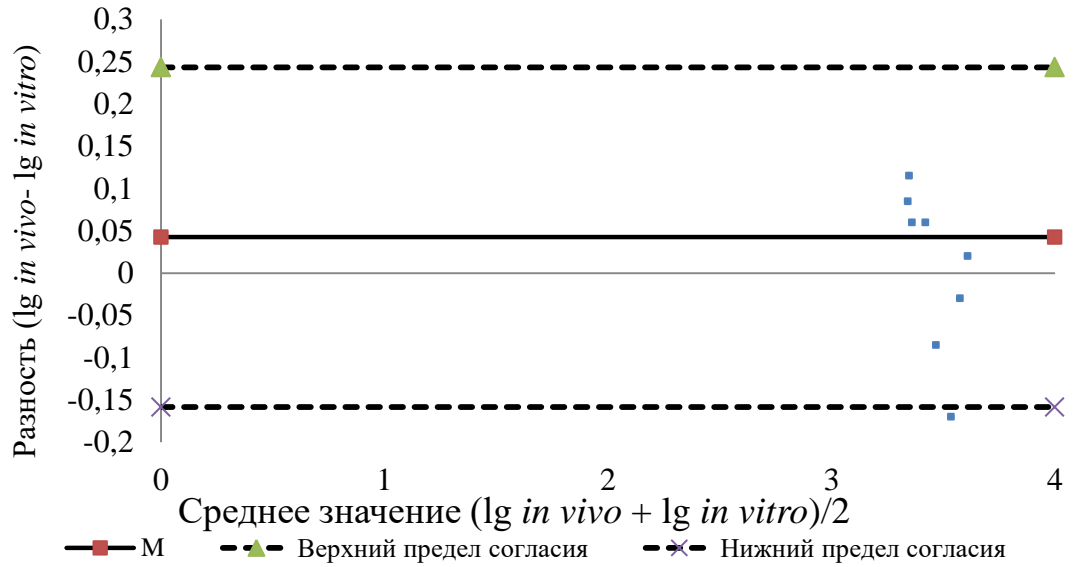


Рисунок 16. Диаграмма Блэнда-Алтмана
(образцы антирабического иммуноглобулина)

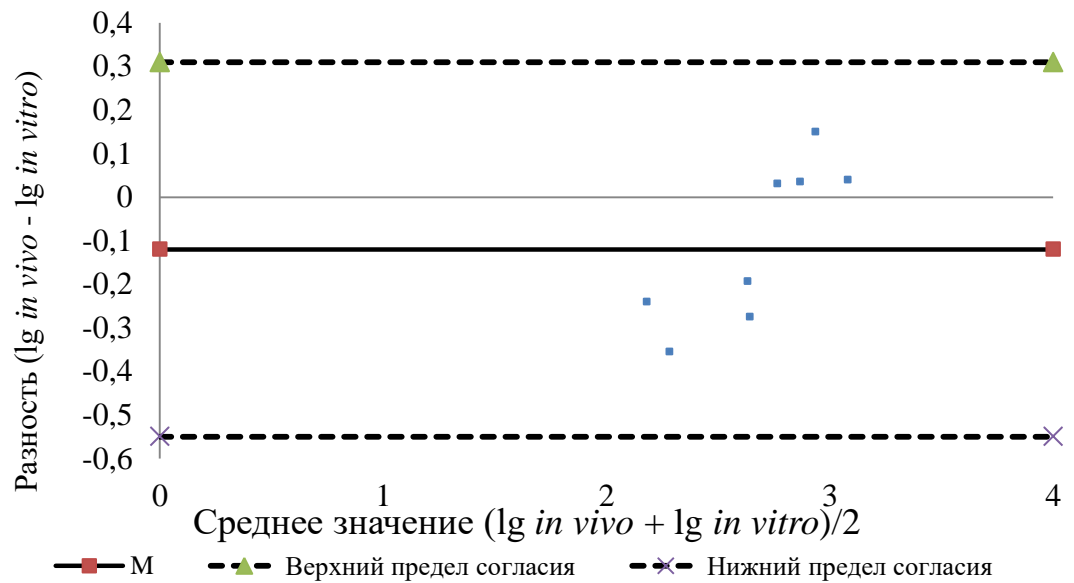


Рисунок 17. Диаграмма Блэнда-Алтмана
(образцы антирабических сывороток)

Анализ данных позволяет сделать выводы о наличии согласованности между значениями специфической активности образцов АИГ и АРС, полученными в результате проведения реакций нейтрализации на клеточной культуре Vero и на белых мышах.

Заключение по главе 5

По результатам исследований разработан стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина с целью применения при постановке метода контроля содержания антирабических антител *in vitro*. Установлена сильная корреляция между показателями специфической активности образцов АИГ и АРС, полученными предлагаемым методом *in vitro* и классическим методом *in vivo*. Сравнение результатов двух типов реакции нейтрализации ВБ методом Блэнда-Алтмана позволило установить наличие согласованности между исследуемыми методами, что свидетельствует о возможности использования предлагаемого подхода определения уровня антирабических антител в качестве метода контроля специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в производстве препарата АИГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие мер профилактики бешенства в Российской Федерации – комплексная задача, одним из направлений которой является разработка и модернизация методов контроля препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина [60]. Одним из показателей антирабического иммуноглобулина, требующих совершенствования методов его определения, является специфическая активность. Значение данного показателя характеризует протективные свойства препарата. В настоящее время для определения специфической активности применяют метод нейтрализации вируса бешенства на белых мышах, который характеризуется длительностью получения результатов, требует использования большого числа стандартных животных и наличия помещений для их содержания. Комитет экспертов ВОЗ по бешенству неоднократно указывал на актуальность и необходимость замены лабораторных животных на альтернативные модели, и на сегодняшний день существует ряд тестов *in vitro*, не уступающих по чувствительности и специфичности тестам с использованием животных. Проведенный анализ литературы показал, что для производства антирабического иммуноглобулина наиболее предпочтительна разработка методического приема определения вируса бешенства и антирабических антител на клеточных культурах с применением иммунофлуоресценции. Такой подход позволит значительно сократить сроки проведения исследования, исключить манипуляции с лабораторными животными и увеличить количество одновременных исследований образцов при условии сохранения высокой чувствительности и специфичности. Более того, последующее внедрение указанного метода будет способствовать гармонизации российских и зарубежных фармакопейных документов в отношении вопросов качества антирабического иммуноглобулина.

Указанные обстоятельства позволили определить направление данной диссертационной работы на разработку метода контроля специфической активности

антирабических сывороток и иммуноглобулина с применением клеточных культур.

Исследования третьей главы настоящей работы направлены на разработку схемы получения флуоресцирующих конъюгатов для обнаружения вируса на клеточной культуре. С целью создания флуоресцирующего диагностикума было принято решение о получении антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства, что связано с высокой консервативностью аминокислотной последовательности данного вирусного белка. Первой задачей собственных исследований явился поиск решения, позволяющего получить максимальное количество рибонуклеопротеина. При выполнении поставленной задачи использовали метод выделения рибонуклеопротеина из инфицированной клеточной культуры. Для максимального накопления вируса бешенства и, соответственно, рибонуклеопротеина, в клеточной культуре было необходимо выбрать оптимальную среду выращивания. На данном этапе работы использовали коммерческие среды Игла MEM, 199 и экспериментальную среду на основе сухого ФГФ, полученного из отходов производства АИГ. Выделить рибонуклеопротеин в максимальном количестве удалось в опыте с использованием экспериментальной питательной среды для выращивания инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры. Концентрация рибонуклеопротеина, выделенного из 10^6 клеток после 72 ч выращивания, составила 0,2 мг, в то время как выращивание на средах 199 и Игла MEM в аналогичных условиях позволило получить 0,14 и 0,13 мг конечного продукта. К преимуществам использования среды на основе ФГФ также следует отнести возможность утилизации отходов производства антирабического иммуноглобулина и уменьшение стоимости процессов культивирования.

На следующем этапе работы проводили исследование по разработке эффективной схемы иммунизации кроликов рибонуклеопротеином с целью получения максимального количества антител к нему. Выбранные схемы иммунизации, обоснованные анализом литературы, представляли собой трехкратное введение раствора, содержащего 400 мкг рибонуклеопротеина, на 0, 43 и 57 день экспери-

мента. С целью повышения антителообразования исследовали действие адъювантов в комплексе с рибонуклеопротеином: наночастиц коллоидного золота размером от 14-17 нм и полиоксидония. Срок наблюдения за иммунизируемыми животными составил 70 дней. По результатам исследования установлен положительный эффект от применения РНП в комплексе с наночастицами коллоидного золота. Сыворотка крови животных, иммунизированных рибонуклеопротеином с коллоидным золотом, к концу эксперимента показала вдвое большую активность (1:25600), чем сыворотка крови животных после иммунизации рибонуклеопротеином с полиоксидонием и без добавления адъюванта (1:12800).

Методом осаждения сульфатом аммония из сывороток были выделены антитела к рибонуклеопротеину и использованы для создания конъюгатов с флуоресцирующими красителями – ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм). Указанные конъюгаты были получены в соответствии со стандартными методами, охарактеризованы по спектроскопическим характеристикам и исследованы на предел чувствительности. Установленные рабочие разведения для конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства с ФИТЦ и Alexa Fluor (532 нм) составили 1:80 и 1:250 соответственно. Полученные конъюгаты использовали в дальнейших экспериментах по разработке метода определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в установленных разведениях наряду с коммерческим ФИТЦ-конъюгатом антирабического иммуноглобулина.

Исследования четвертой главы данной диссертации посвящены обоснованию условий определения вирусного антигена и уровня антирабических антител на клеточной культуре. Основным отличием разрабатываемого метода от существующих прототипов является использование фиксированного вируса бешенства, полученного в результате адаптации производственного штамма «Москва 3253» к клеточной культуре Vero. При разработке предлагаемого метода определения специфической активности исследовали возможность использования клеточной культуры Vero и ВНК-21. Применение последней обусловлено общими

рекомендациями по обнаружению вируса бешенства и определению уровня антирабических антител на культуре клеток с помощью иммунофлуоресценции. Результаты исследований показали преимущество использования клеточной культуры Vero, питательной среды Игла MEM с добавлением сыворотки КРС от 2 до 5 % при времени инкубации (72 ± 4) ч.

Задачами дальнейших экспериментов явились установление условий фиксации и окрашивания, а также поиск оптимальной рабочей дозы вируса и времени нейтрализации вируса при исследовании уровня антител. В качестве фиксирующего агента целесообразно использование 80 % раствора ацетона при инкубации в течение (15 ± 5) мин в холодильнике или при комнатной температуре. В качестве альтернативного фиксатора допускается использование 4 % раствора формальдегида при фиксации в аналогичных условиях. Время окрашивания клеточных культур как коммерческим, так и экспериментально полученными флуоресцирующими конъюгатами, взятыми в рабочих разведениях, составило (60 ± 10) мин. Следует отметить, что в разрабатываемом методе *in vitro* допускается применение всех исследуемых в настоящей работе флуоресцирующих конъюгатов. Тем не менее, с учетом стоимости изготовления наиболее предпочтительно использование конъюгата антител к рибонуклеопротеину с ФИТЦ.

Поиск рабочей дозы вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» для применения в разрабатываемом методе *in vitro* осуществляли в диапазоне 50-5000 ID₅₀/0,05 мл. В качестве оптимального значения рабочего разведения вируса был установлен интервал 100-300 ID₅₀/0,05 мл. С целью определения оптимального периода нейтрализации вируса антирабическими антителами были исследованы временные интервалы от 10 до 60 мин. Минимально допустимым значением времени нейтрализации вируса, при котором удавалось фиксировать стабильные значения титров антирабических антител, был определен период в 40 мин.

Заключительный этап исследований, представленный в главе 5, требовал разработки и аттестации стандартного образца предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтра-

лизации вируса на культуре клеток, а также проведения сравнительного анализа результатов исследования специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина методами *in vivo* и *in vitro*. В качестве образца сравнения использовали антирабический иммуноглобулин, соответствующий требованиям Европейской Фармакопеи. Для разработанного стандартного образца было установлено значение активности, составившее $(180,8 \pm 18,8)$ МЕ/мл. Полученный стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса на культуре клеток (сер. 41-01-20) был утвержден и внесен в реестр стандартных образцов предприятия, допущенных к применению в экспериментально-производственных подразделениях ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Предлагаемый метод определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина наряду со стандартным образцом предприятия составили адекватную аналитическую систему, эффективность которой была исследована в сравнении с применяемым в настоящее время методом контроля *in vivo*. С этой целью было проведено определение значения специфической активности одинаковых образцов АРС и АИГ разработанным методом *in vitro* и в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах. В ходе исследования 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 $(\pm 1,96) \times SD$) определения специфической активности, полученных указанными методами. Данные экспериментов свидетельствуют о возможности использования предлагаемого методического приема для контроля специфической активности АРС и АИГ в производственном процессе.

По результатам проведенной работы предложен и экспериментально обоснован комплекс биотехнологических решений по разработке метода определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на культуре клеток, 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. Полученные данные будут способствовать внедрению разработанного методического приема *in vitro* в производство препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина с целью определения активности готового иммунобиологического лекарственного средства. Разработанный метод может быть применен для массового мониторинга индивидуальных показателей активности антирабических сывороток продуцентов.

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 адъюванта (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 адъюванта и без применения адъюванта.

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 ВБ 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 $(180,8 \pm 18,8)$ 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.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные опытные данные будут способствовать внедрению разработанного методического приема в производство иммунобиологического лекарственного средства «Имуноглобулин 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 продуцента.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИГ	антирабический иммуноглобулин
АРС	антирабическая сыворотка
а.о.	аминокислотный остаток
ВБ	вирус бешенства
ВНА	вируснейтрализующие антитела
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГФ	Государственная Фармакопея
ДИА	дот-иммуноанализ
ИФА	иммуноферментный анализ
кДа	килодальтон
КРС	крупный рогатый скот
МДа	мегадальтон
МЕ	международная единица
МУ	методические указания
МФА	метод флуоресцирующих антител
НГУК-1	клетки невриномы Гассерова узла крысы
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОФС	общая фармакопейная статья
ПААГ-ДСН	полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия
ПР	промышленный регламент

РГА	реакция гемагглютинации
РДП	реакция диффузной преципитации
РН	реакция нейтрализации
РНГА	реакция непрямой гемагглютинации
РНК	рибонуклеиновая кислота
РСК	реакция связывания комплемента
РФ	Российская Федерация
СанПиН	санитарные правила и нормы
СО	стандартный образец
СОП	стандартный образец предприятия
СП	санитарные правила
ФИТЦ	флуоресцеин-5-изотиоцианат
ФГБНУ ВНИТИБП	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»	Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»
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
ФСП	фармакопейная статья предприятия
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
PMSF	фенилметилсульфонилфлуорид
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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, Е.Г. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет / Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров, О.А. Лобовикова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 3. – С. 58–62.
2. Абрамова, Е.Г. Разработка стандартного образца предприятия (СОП) специфической активности иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади / Е.Г. Абрамова, О.А. Лобовикова, И.В. Шульгина [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 4. – С.160–164.
3. Абрамова, Е.Г. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина / Е.Г. Абрамова, С.В. Генералов, Ж.В. Матвеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 2. – С. 95–101.
4. Авдеева, Ж.И. Иммуноадьювантный эффект цитокинов / Ж.И. Авдеева, Н.А. Алпатова, С.Е. Акользина [и др.] // Тихоокеанский мед. журнал. – 2009. – Вып. 3. – С. 19–22.
5. Антонычева, М.В. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / М.В. Антонычева, С.А. Нижегородцев, С.А. Еремин [и др.] // Патент № 2425866 РФ, МПК C12N 1/20, C12R 1/63; 2011.
6. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
7. Бабак, В.А. Оптимальные режимы культивирования линии клеток ВНК-21(С-13) / В.А. Бабак, Ю.В. Ломако, А.А. Гусев [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена Знак Почета Государственная академия ветеринарной медицины». – 2011. – Т. 47, №2–1. – С. 7–11.
8. Баркова, И.П. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах / И.П. Баркова,

Ф.Г. Нагиева, В.Г. Никулина [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 4. – С. 323–326.

9. Барышева, Е.С. Биохимия крови: лабораторный практикум / Е.С. Барышева, К.М. Бурова // Оренбург: Оренбургский государственный университет, ЭБС АСВ, 2013. – 141 с.

10. Барышников, П.И. Современные проблемы бешенства животных / П.И. Барышников, В.Н. Грязин, А.В. Зайковская. – М.: КолосС, 2007. – 81 с.

11. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э.А. Преображенская. – М.: Колос, 2006. – 248 с.

12. Бондарев, В.П. Проблемы аттестации отраслевых стандартных образцов для контроля качества иммунобиологических лекарственных препаратов / В.П. Бондарев, И.В. Борисевич, Р.А. Волкова [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. – 2013. – № 2. – С. 28–32.

13. Вишняков, И.Ф. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител / И.Ф. Вишняков, В.В. Недосеков, К.Н. Груздев [и др.] // Патент № 97116427 РФ, МПК G01N33/569, A61K39/205; 01.10.97.

14. Волкова, Р.А. Применение ракетного иммуноэлектрофореза для определения гликопротеина в концентрированных антирабических вакцинах / Р.А. Волкова, В.М. Рунова, Л.Н. Романова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1994. – Т. 39, № 2. – С. 68–71.

15. Волкова, Р.А. Проблемы оценки неопределенности методик испытаний и стандартных образцов иммунобиологических лекарственных средств / Р.А. Волкова, О.В. Фадейкина // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 27–31.

16. Генералов, С.В. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, Lissavirus, Rhabdoviridae) / С.В. Генералов, П.С. Ерохин, Т.Ю. Красовская [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 5. – С. 227–232.

17. Генералов, С.В. Питательная среда для культивирования перевиваемых клеточных линий млекопитающих / С.В. Генералов, М.В. Антонычева, Е.Г. Абрамова [и др.] // Патент № 2673718 РФ, МПК C12N 1/20; 2018.
18. Генералов, С.В. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, Ж.В. Матвеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Вып. 2 (112). – С. 78–81.
19. Генералов, С.В. Проточная цитометрия при анализе вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина / С.В. Генералов, А.Л. Кравцов, В.А. Кожевников [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 107–114.
20. Генералов, С.В. Способ определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на клеточной культуре с применением атомно-силовой микроскопии / С.В. Генералов, П.С. Ерохин, Е.Г. Абрамова [и др.] // Патент № 2688334 РФ, МПК C12Q 1/70, G01N 33/532; 2019.
21. Германчук, В.Г. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I–II групп / В.Г. Германчук, А.П. Семакова, Н.Ю. Шавина [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – Вып. 4. – С. 33–38.
22. ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. – М.: Стандартинформ, 2014. – 10 с.
23. Грибенча, С.В. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства / С.В. Грибенча, А.Ю. Козлов, Л.В. Костина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58, № 5. – С. 38–43.
24. Грибенча, С.В. Рабдовирусы (Rhabdoviridae) / С.В. Грибенча, Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: Медицинское информационное агентство, 2013. – С. 197–202.

25. Груздев, К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков // М.: Аквариум, 2001. – 304 с.
26. Гулюкин, А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А.М. Гулюкин // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 5–10.
27. Дедков, В.Г. Разработка и апробация набора реагентов для определения классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени / В.Г. Дедков, А.А. Девяткин, Е.М. Полещук [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 5. – С. 235–240.
28. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях. Серии европейских договоров – № 123 [Электронный ресурс] // Страсбург, 18 марта 1986 года. – Режим доступа: <https://rm.coe.int/168007aba8>.
29. Елисеев, А.К. Питательная среда для суспензионного культивирования клеток млекопитающих / А.К. Елисеев, Н.В. Мельник, Н.И. Зенов [и др.] // Патент № 2612355 РФ, МПК С12N 5/02; 2017.
30. Елисеев, А.К. Питательная среда для суспензионного культивирования клеток млекопитающих / А.К. Елисеев, С.Н. Красуткин, Н.И. Зенов [и др.] // Патент № 2558253 РФ, МПК С12N 5/07, С12N 5/02, С12R 1/91; 2015.
31. Жданов, В.М. Общая и частная вирусология / ред. В.М. Жданов, С.Я. Гайдамович // М.: Медицина, 1982. – 1104 с.
32. Жестерев, В.И. Способ изготовления антирабической инактивированной вакцины для сельскохозяйственных животных / В.И. Жестерев, Т.Ф. Горшкова, О.Г. Лаптева [и др.] // Патент № 2244557 РФ, МПК А61К 39/205, А61Р 31/12; 2005.

33. Жилин, Е.С. Выбор системы определения биологической активности вируса бешенства штамм «VRC-RZ2» / Е.С. Жилин, Э.К. Акматова, А.Р. Сансызбай // Известия ВУЗов Кыргызстана. – 2013. – № 4. – С. 131–138.

34. Жулидов, И.М. Биотехнологические аспекты переработки фибрина – отхода производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина / И.М. Жулидов, Е.Г. Абрамова, М.В. Антонычева [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2011. – Т. 7, № 3. – С. 17–23.

35. Жулидов, И.М. Разработка биотехнологических приемов малоотходных технологий в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Жулидов Иван Михайлович. – Саратов, 2013. – 18 с.

36. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области / О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 186–192.

37. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей / О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.М. Гулюкин [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 3. – С. 101–108.

38. Зайцев, Б.Н. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии / Б.Н. Зайцев, О.С. Таранов, Н.Б. Рудометова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23, № 3. – С. 337–342.

39. Игнатъев, Г.М. Молекулярно-генетическое исследование стабильности и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой / Г.М. Игнатъев, А.С. Оксанич, Л.П. Антонова [и др.] //

БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 107–115.

40. Каркищенко, Н.Н. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских целях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева // М.: Профиль–2С, 2010. – 358 с.

41. Кошеметов, Ж.К. Оптимизация условий постановки полимеразной цепной реакции для диагностики бешенства / Ж.К. Кошеметов, В.М. Матвеева, В.М. Строчков [и др.] // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – Т. 121, № 11. – С. 121–126.

42. Кравцов, А.Л. Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии / А.Л. Кравцов, С.В. Генералов, В.А. Кожевников [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 3. – С. 18–25.

43. Краснов, Я.М. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ штамма вируса бешенства «Moscow 3253», адаптированного к перевиваемой линии клеток Vero / Я.М. Краснов, Ж.В. Альхова, С.В. Генералов [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2020. – Т. 38, № 4. – С. 196–202.

44. Крюкова, Е.Н. Совершенствование технологии производства питательной среды для суспензионного культивирования клеток млекопитающих / Е.Н. Крюкова, А.Я. Самуйленко, В.В. Ельников [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 2. – С. 6–9.

45. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин // М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

46. Леонтьев, Д.А. Система вторичных стандартных образцов в лабораториях контроля качества лекарственных средств / Д.А. Леонтьев // Ведомости НЦЭСМП. – 2016. – №1. – С. 50–55.

47. Лобанова, В.А. Биотехнологические аспекты совершенствования методов выявления антител к вирусу бешенства животных / В.А. Лобанова, В.И.

Клюкина // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 1. – С. 62–75.

48. Лосич, М.А. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA-SV 20M вируса бешенства / М.А. Лосич, О.Н. Зайкова, И.В. Непоклонова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2018. – Т. 63, № 5. – С. 224–232.

49. Львов, Д.К. Медицинская вирусология: Руководство / Д.К. Львов // М.: ООО Медицинское информационное агентство, 2008. – 656 с.

50. Мазуркова, Н.А. Создание питательной среды на основе гидролизата сои, полученного с использованием бромелайна, для клеток MDCK и Vero и оценка в них ростовых свойств вакцинных штаммов вируса гриппа / Н.А. Мазуркова, Г.П. Трошкова, Л.Н. Шишкина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2011. – № 1. – С. 86–90.

51. Макаров, В.В. Бешенство / В.В. Макаров // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 1. – С. 28–34.

52. Маркова, Е.В. Инновационный подход к количественной оценке гликопротеина в вакцинах против бешенства / Е.В. Маркова, И.Н. Матвеева, В.М. Попова // Таврический вестник аграрной науки. – 2017. – Т. 10, № 2. – С. 17–28.

53. Матвеева, Ж.В. Разработка и совершенствование биотехнологических приемов приготовления рабического антигена для производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Матвеева Жанна Владимировна. – Саратов, 2013. – 22 с.

54. Меркулов, В.А. Современные подходы к разработке стандартных образцов для оценки качества фармацевтических субстанций/ В.А. Меркулов, Е.И. Саканян, В.И. Климов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т.49, № 11. – С. 54–56.

55. Меркулов, В.А. Фармакопейные стандартные образцы и практика их применения в отечественной системе стандартизации лекарственных средств / В.А. Меркулов, Е.И. Саканян, Р.А. Волкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 40–43.

56. Метлин, А.Е. Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Метлин Артем Евгеньевич. – Владимир, 2004. – 26 с.
57. Метлин, А.Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов / А.Е. Метлин // Ветеринария сегодня. – 2017. – Т.22, № 3. – С. 52–57.
58. Мовсисянц, А.А. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства / А.А. Мовсисянц, Ю.В. Олефир // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – Т.19, № 1. – С. 10–16.
59. Мовсисянц А.А. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов – новое в Государственной фармакопее Российской Федерации / А.А. Мовсисянц, В.П. Бондарев, Ю.В. Олефир [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – №2.– С. 38–41.
60. Мовсисянц, А.А. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей / А.А. Мовсисянц, А.Ю. Бутырский, В.П. Бондарев [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 84, № 5. – С. 85–89.
61. Морогова, В.М. Среда для репродукции вируса бешенства в культуре клеток почек сирийских хомяков / В.М. Морогова, Д.В. Крутилина, Н.Р. Бикметова [и др.] // Авторское свидетельство СССР 1403614, МПК С12N 5/00; заявка 10.07.1986, опубликовано 27.09.1999.
62. МУ 3.3.1.1099-2002 Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Методические указания. – М., 2002. – 28 с.
63. Нагиева, Ф.Г. Репродукция фиксированного вируса бешенства в культуре перепелиных фибробластов, растущих в суспензии / Ф.Г. Нагиева, М.С. Бектемирова, К.Ш. Матевосян [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1980. – № 4. – С. 429–431.

64. Недосеков, В.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства / В.В. Недосеков // Ветеринарная патология. – 2002. – Т. 1. – С. 41–47.
65. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 256 с.
66. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, Е.Б. Ежлова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 3. – С. 27–32.
67. ОФС.1.2.1.0004.15 Ионметрия. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том I). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 532–541.
68. ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том I). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 1026–1041.
69. ОФС.1.1.0007.18 Стандартные образцы. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том I). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 185–202.
70. ОФС.1.1.0014.15 Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том I). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 319–369.
71. ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Общая фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том I). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 650–669.

72. Петрова, И.Д. Концентрирование вирусов и электронная микроскопия / И.Д. Петрова, Б.Н. Зайцев, О.С. Таранов // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24, № 3. – С. 276–283.

73. Подборонова, Н.А. Диагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа / Н.А. Подборонова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров [и др.] // Патент № 2360252 РФ, МПК G01N 33/532; 2009.

74. Полещук, Е.М. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России / Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров, С.В. Грибенча // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58, № 3. – С. 9–16.

75. Полещук, Е.М. Анализ особенностей эпизоотолого-эпидемической ситуации и риск заражения бешенством в Российской Федерации в начале XXI века/ Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. № 4. – С. 16–25.

76. Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев): [утверждено Министром здравоохранения РФ 23.04.2003 г. и президентом РАМН 22.04.2003 г.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.scbmt.ru/mag/polojenie.pdf>.

77. Правила надлежащей лабораторной практики: [приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01 апреля 2016 г.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.mos.ru/upload/documents/oiv/prikaz_minzdrava_rossii_ot_1_aprelya_2016_g_n_199n.pdf.

78. Рахманин, П.П. Способ получения инактивированной антирабической вакцины при безопорном выращивании клеток и репродукции в них вируса в укороченном цикле культивирования / П.П. Рахманин, О.С. Захарченко, С.В. Крюков [и др.] // Патент № 2537183 РФ, МПК А61К 39/205, А61Р 31/12; 2014.

79. Ребриков, Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Д.Ю. Трофимов, Г.А. Саматов [и др.] // М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
80. СанПиН 3.3686-21 Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. – М., 2021. – 1092 с.
81. Селимов, М.А. Бешенство / М.А. Селимов // М.: Медицина, 1978. – 336 с.
82. Сливко, И.А. Способ титрования антирабических вируснейтрализующих антител / И.А. Сливко, В.В. Недосеков, В.И. Жестерев [и др.] // Патент № 2254575 РФ, МПК G01N33/569; 2005.
83. СП 1.3.2322-2008 Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила. – М., 2008. – 55 с.
84. Спицын, А.Н. Спектрофотометрическая характеристика конъюгатов иммуноглобулинов для диагностики возбудителей особо опасных инфекций / А.Н. Спицын, Д.В. Уткин, М.Н. Киреев [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2020. – Т. 128, № 3. – С. 430–434.
85. Стародубова, Е.С. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития / Е.С. Стародубова, О.В. Преображенская, Ю.В. Кузьменко [и др.] // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, № 4. – С. 577–584.
86. Степанова, М.Н. Подбор компонентов поддерживающей питательной среды, влияющих на рост и репродукцию вируса бешенства на перевиваемой клеточной культуре Vero B // Фундаментальные и прикладные научные исследования: матер. междунар. науч.-практ. конф. – Москва, 2017. – С. 179–182.
87. Сугобаева, Б.П. Выявление рабических антител с помощью РСК / Б.П. Сугобаева, Ж.С. Дадабаева, Т.С. Сайдулдин // Диагностика, лечение и профилактика инфекционных болезней животных Казахстана. – 1989. – С. 45–53.
88. Сухарьков, А.Ю. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта / А.Ю.

Сухарьков, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 6. – С. 12–14.

89. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты: Получение, состав, применение / Л.Я. Телишевская // М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.

90. Тертон, М. Новые методы иммуноанализа / М. Тертон, Д.Р. Бангхем, К.А. Колкотт [и др.]; под общ. ред. У. Коллинза // М.: Мир, 1991. – 280 с.

91. Тучков, И.В. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства / И.В. Тучков, Я.М. Краснов, А.А. Горяев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 4. – С. 73–75.

92. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 691 с.

93. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель // М.: Медицина, 1987. – 472 с.

94. ФС.3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Фармакопейная статья / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издание (Том IV). – М.: ФЭМБ. – 2018. – С. 5503–5514.

95. Хисматуллина, Н.А. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, Э.А. Шуралев [и др.] // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9, № 3. – С. 276–280.

96. Цетлин, Е.М. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины / Е.М. Цетлин, В.А. Волкова // Вопросы вирусологии. – 1996. – № 1. – С. 21–24.

97. Чернов, С.М. Результаты использования прямого твердофазного иммуноферментного анализа для оценки специфической активности антирабических вакцин / С.М. Чернов, Е.М. Цетлин, А.Д. Ботвинкин [и др.] //

Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1991. – № 5. – С. 30–33.

98. Чупин, С.А. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. / С.А. Чупин, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58, № 4. – С. 44–49.

99. Шарапова, Н.А. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе / Н.А. Шарапова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 103. – С. 63–66.

100. Щелканов, М.Ю. Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, выделенного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.) / М.Ю. Щелканов, А.А. Девяткин, В.Ю. Ананьев [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – Т. 61, № 4. – С. 180–186.

101. Afonso, C.L. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016 / C.L. Afonso, G.K. Amarasinghe, K. Banyai [et al.] // Archives of virology. – 2016. – Vol. 8, № 161. – P. 2351–2360.

102. Ahmed, K. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals / K. Ahmed, O. Wimalaratne, N. Dahal [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2012. – Vol. 86, № 4. – P. 736–740.

103. Albertini, A.A. Rabies virus transcription and replication / A.A. Albertini, R.W. Ruigrok, D. Blondel // Advances in Virus Research. – 2011. – Vol. 79. – P. 1–22.

104. Asgary, V. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine / V. Asgary, A. Shoari, F. Baghbani-Arani [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2016. – Vol. 11. – P. 3597–3605.

105. Barrett, P. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines / P. Barrett, W. Mundt, O. Kistner [et al.] // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2009. – Vol. 8, № 5. – P. 607–618.

106. Bedekovic, T. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test – Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies / T. Bedekovic, N. Lemo, I. Lojkic [et al.] // *J. of virological methods*. – 2013. – Vol. 189. – P. 204–208.

107. Bell, J.F. Susceptibility of carnivora to rabies virus administered orally / J.F. Bell, G.J. Moore // *Am. J. Epidemiol.* – 1971. – Vol. 93, № 3. – P. 176–182.

108. Black, E.M. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology / E.M. Black, J.P. Lowings, J. Smith [et al.] // *J. Virol. Meth.* – 2002. – Vol. 105, № 1. – P. 25–35.

109. Bland, J.M. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement / J.M. Bland, D.G. Altman // *Lancet*. – 1986. – Vol. 8476, № 1. – P. 307–10.

110. Bordignon, J. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry / J. Bordignon, F. Comin, S. Ferreira [et al.] // *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. – 2002. – Vol. 44, № 3. – P. 151–154.

111. Bordignon, J. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection / J. Bordignon, S.C.P. Ferreira, G.M.M. Caporale [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2002. – Vol. 105. – P. 181–186.

112. Bourhy, H. The origin and phylogeography of dog rabies virus / H. Bourhy, J. Reynes, E. Dunham [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2008. – Vol. 89. – P. 2673–2681.

113. Bronnert, J. Organ transplantations and rabies transmission / J. Bronnert, H. Wilde, V. Tepsumethanon [et al.] // *Journal of Travel Medicine*. – 2007. – Vol. 14, № 3. – P. 177–180.

114. Brookes, S. Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses /

S. Brookes, G. Parsons, N. Johnson [et al.] // *Vaccine*. – 2005. – Vol. 23, № 32. – P. 4101–4109.

115. Caporale, G.M.M. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil / G.M.M. Caporale, A. de C.R. Silva, Z.M.P. Peixoto [et al.] // *J. of clinical laboratory analysis*. – 2009. – Vol. 23. – P. 7–13.

116. Charlton, K.M. Experimental oral and nasal transmission of rabies virus in mice / K.M. Charlton, G.A. Casey // *Can. J. Comp. Med.* – 1979. – Vol. 43, № 1. – P. 10–15.

117. Chen, S. Rabies Virus Transmission in Solid Organ Transplantation, China, 2015-2016 / S. Chen, H. Zhang, M. Luo [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 23, № 9. – P. 1600–1602.

118. Chhabra, M. Development and evaluation of an *in vitro* isolation of street rabies virus in mouse neuroblastoma cells as compared to conventional tests used for diagnosis of rabies / M. Chhabra, V. Mittal, R. Jaiswal [et al.] // *Indian J. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 25, № 3. – P. 263–266.

119. Cliquet, F. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody / F. Cliquet, M. Aubert, L. Sagné // *J. Immunol. Methods*. – 1998. – Vol. 212, № 1. – P. 79–87.

120. Cliquet, F. The fluorescent antibody virus neutralization test / F. Cliquet, M. Wasniewski // In: *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention*. Vol. 2. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2015. – P. 217–231.

121. Constantine, D.G. Absence of prenatal infection of bats with rabies virus / D.G. Constantine // *Journal of Wildlife Disease*. – 1986. – Vol. 22, № 2. – P. 249–250.

122. Constantine, D.G. Rabies transmission by nonbite route / D.G. Constantine // *Public health reports*. – 1962. – Vol. 77, № 4. – P. 287–289.

123. Constantine, D.G. Rabies virus in nasal mucosa of naturally infected bats / D.G. Constantine, R.W. Emmons, J.D. Woodie // *Science*. – 1972. – Vol. 175. – P. 1255–1256.

124. Correa-Giron, E.P. The infectivity and pathogenesis of rabiesvirus administered orally / E.P. Correa-Giron, R. Allen, S.E. Sulkin // *Am. J. Epidemiol.* – 1970. – Vol. 91, № 2. – P. 203–215.
125. Crepin, P. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid / P. Crepin, L. Audru, Y. Rotivel [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, № 4. – P. 1117–1121.
126. Dastkhosh, M. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein / M. Dastkhosh, P. Rahimi, S. Haghghat [et al.] // *Jundishapur journal of microbiology.* – 2014. – Vol. 9, № 7. – P. 1–4.
127. David, D. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains / D. David, B. Yakobson, D. Rotenberg [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2002. – Vol. 87. – P. 111–118.
128. Dietzschold, B. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus / B. Dietzschold, W.H. Wunner, T.J. Wiktor [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1983. – Vol. 80. – P. 70–74.
129. Dietzschold, B. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein / B. Dietzschold, H.H. Wang, C.E. Rupprecht [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 9165–9169.
130. Durr, S. Rabies Diagnosis for Developing Countries / S. Durr, S. Naissengar, R. Mindekem [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2008. – Vol. 3, № 2. – P. e206.
131. Dykman, L.A. Immunological properties of gold nanoparticles / L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov // *Chem. Sci.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1719–1735.
132. Fischman, H.R. Oral transmission of rabies virus in experimental animals / H.R. Fischman, F.E. Ward // *American journal of epidemiology.* – 1968. – Vol. 88, № 1. – P. 132–138.
133. Fisher, Ch.R. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers / Ch.R. Fisher, D.G. Streicker, M.J. Schnell // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2018. – Vol. 16, № 4. – P. 241–255.

134. Flamand, A. Transcriptional mapping of rabies virus *in vivo* / A. Flamand, J.F. Delagneau // *J. Virol.* – 1978. – Vol. 28. – P. 518–523.
135. Fooks, A.R. Rabies scientific basis of the disease and its management / A.R. Fooks, A.C. Jackson. – Elsevier Science, 2020. – 4 th ed. – 750 p.
136. Franco, M. Polygenic control of antibody production and correlation with vaccine induced resistance to rabies virus in high and low antibody responder mice / M. Franco, S. Massa, R.C. Vassao [et al.] // *Arch Virol.* – 1996. – Vol. 141, № 8. – P. 1397–1406.
137. Gaudin, Y. Folding of rabies virus glycoprotein, epitope acquisition, and interaction with endoplasmic reticulum chaperones / Y. Gaudin // *J. Virol.* – 1997. – Vol. 71. – P. 3742–3750.
138. Gaudin, Y. Rabies virus glycoprotein is a trimer / Y. Gaudin, R.W.H. Ruigrok, C. Tuffereau [et al.] // *Virology.* – 1992. – Vol. 187. – P. 627–632.
139. Gibbons, R.V. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission / R.V. Gibbons // *Ann. Emerg. Med.* – 2002. – Vol. 39, № 5. – P. 528–536.
140. Goldwasser, R.A. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigen / R.A. Goldwasser, R.E. Kissling // *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine.* – 1958. – Vol. 98, № 2. – P. 219–223.
141. Gunawardena, P.S. Lyssavirus in Indian Flying Foxes, Sri Lanka / P.S. Gunawardena, D.A. Marston, R.J. Ellis [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 22, № 8. – P. 1456–1459.
142. Hacibektaşoğlu, A. Comparison of PVRV and HDCV rabies vaccines as to immunity, reliability and protective value / A. Hacibektaşoğlu, A. Inal, C. Eyigün [et al.] // *Mikrobiyol. Bült.* – 1992. – Vol. 26. – P. 26–36.
143. Heaton, P.R. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses / P.R. Heaton, P. Johnstone, L.M. McElhinney [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – Vol. 35, № 11. – P. 2762–2766.

144. Hogli, J. Rabies virus IgG antibody immune gold-labeled test paper and preparation method thereof / J. Hogli, X. Xiaohong, X. Zhenqiang [et al.] // Patent № 104360061 CN, G01N33/569; 2015.
145. Holloway, B.P. Rabies virus-induced RNA synthesis in BHK-21 cells / B.P. Holloway, J.F. Obejeski // J. Gen. Virol. – 1980. – Vol. 49. – P. 181–195.
146. Horwitz, J.A. Structure of a rabies virus polymerase complex from electron cryo-microscopy / J.A. Horwitz, S. Jenni, S.C. Harrison [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2020. – Vol. 117, № 4. – P. 2099–2107.
147. Hostnik, P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus / P. Hostnik // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. – 2000. – Vol. 47, № 6. – P. 423–427.
148. Howard, D.R. Transplacental transmission of rabies virus from a naturally infected skunk / D.R. Howard // Am. J. Vet. Res. – 1981. – Vol. 42, № 4. – P. 691–692.
149. Hu, Sh.-Ch. Lyssavirus in Japanese Pipistrelle, Taiwan / Sh.-Ch. Hu, Ch.-L. Hsu, M.-Sh. Lee [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2018. – Vol. 24, № 4. – P. 782–785.
150. Human rabies immunoglobulin, monograph 0723. European Pharmacopoeia 10th ed. Council of Europe, Strasbourg, France; 2019. – P. 2871–2872.
151. Hurisa, B. Production of cell culture based anti- rabies vaccine in Ethiopia / B. Hurisa, A. Mengesha, B. Newayesilassie [et al.] // Procedia in Vaccinology. – 2013. – Vol. 7. – P. 2–7.
152. Iseni, F. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures / F. Iseni, A. Barge, F. Baudin [et al.] // J. Gen. Virol. – 1998. – Vol. 79. – P. 2909–2919.
153. Jaiaroensup, W. Safety and efficacy of purified Vero cell rabies vaccine given intramuscularly and intradermally. (Results of a prospective randomized trial) / W. Jaiaroensup, J. Lang, P. Thipkong [et al.] // Vaccine. – 1998. – Vol. 16, № 16. – P. 1559–1562.
154. Jallet, C. *In Vitro* ELISA Test to Evaluate Rabies Vaccine Potency / C. Jallet, N. Tordo // J. Vis. Exp. – 2020. – № 159. – P. e59641.

155. Kang, B. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus / B. Kang, J. Oh, C. Lee [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2007. – Vol. 145, № 1. – P. 30–36.
156. Kasempimolporn, S. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of rabies virus in dog saliva samples / S. Kasempimolporn, W. Saengseesom, S. Huadsakul [et al.] // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2011. – Vol. 23, № 6. – P. 1197–1201.
157. Korimbocus, J. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use / J. Korimbocus, N. Dehay, N. Tordo [et al.] // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34, № 28. – P. 3310–3316.
158. Krämer, B. A multi-dose serological assay suitable to quantify the potency of inactivated rabies vaccines for veterinary use / B. Krämer, E. Kamphuis, K.M. Hanschmann [et al.] // *Biologicals*. – 2013. – Vol. 41, № 6. – P. 400–406.
159. Kristensson, K. Rabies: interactions between neurons and viruses. A review of the history of Negri inclusion bodies / K. Kristensson, D.K. Dastur, D.K. Manghani [et al.] // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 1996. – Vol. 22, № 3. – P. 179–187.
160. Larghi, O.P. Sensitivity of BHK-21 cells supplemented with diethylaminoethyl-dextran for detection of street rabies virus in saliva samples / O.P. Larghi, A.E. Nebel, L. Lazaro [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1975. – Vol. 1, № 3. – P. 243–245.
161. Lembo, T. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis / T. Lembo, M. Niezgodna, A. Velasco-Villa [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 310–313.
162. Li, J. Analysis of full-length gene sequence of rabies vaccine virus aG strain / J. Li, S.C. Cao, L.T. Shi [et al.] // *Bing Du Xue Bao*. – 2013. – Vol. 29, № 4. – P. 404–409.
163. Liu, P. Interactions amongst rabies virus nucleoprotein, phosphoprotein, and the genomic RNA in virus-infected and transfected cells / P. Liu, J. Yang, X. Wu [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2004. – Vol. 85. – P. 3725–3734.

164. Luekrajan, T. Production of antirabies serum of equine origin / T. Luekrajan, J. Wangsai, P. Phanuphak // *Laboratory techniques in rabies*. 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 401–404.

165. Lvov, D.K. Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology / D.K. Lvov, M.Yu. Shchelkanov, S.V. Alkhovsky [et al.]. – Elsevier Science Publishing, 2015. – 440 p.

166. Madhusudana, S.N. Comparison of safety and immunogenicity of purified chick embryo cell rabies vaccine (PCECV) and purified Vero cell rabies vaccine (PVRV) using the Thai Red Cross intradermal regimen at a dose of 0.1 ml / S.N. Madhusudana, T.V. Sanjay, B.J. Mahendra [et al.] // *Hum. Vaccin.* – 2006. – Vol. 2, № 5. – P. 200–204.

167. Madhusudana, S.N. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies / S.N. Madhusudana, S. Saraswati // *J. Clin. Virol.* – 2003. – Vol. 27, № 2. – P. 129–135.

168. Madhusudana, S.N. Economical multi-site intradermal regimen with purified chick embryo cell vaccine (Rabipur) prevents rabies in people bitten by confirmed rabid animals / S.N. Madhusudana, N.P. Anand, R. Shamsundar // *Int. J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 6, № 3. – P. 210–214.

169. Madhusudana, S.N. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans / S.N. Madhusudana, S. Subha, U. Thankappan [et al.] // *Virol. Sin.* – 2012. – Vol. 27, № 5. – P. 299–302.

170. Mani, R.S. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances / R.S. Mani, S.N. Madhusudana // *Sci. World J.* – 2013. – P. 1–10.

171. Martell, M.A. Transplacental transmission of bovine rabies after natural infection / M.A. Martell, F.C. Montes, R. Alcocer // *The Journal of Infectious Diseases.* – 1973. – Vol. 127, № 3. – P. 291–293.

172. Mavrakis, M. Isolation and characterization of the rabies virus N-P complex produced in insect cells / M. Mavrakis, E. Iseni, C. Mazza [et al.] // *J. Virol.* – 2003. – Vol. 305. – P. 406–414.

173. Meslin, F.X. Laboratory techniques in rabies / edited by F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. – 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – 469 p.
174. Metlin, A. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97 / A. Metlin, L. Paulin, S. Suomalainen [et al.] // *Virus Research*. – 2008. – Vol. 132, № 1–2. – P. 242–247.
175. Miranda, N.L. A comparative evaluation of a new immunoenzymatic test (RREID) with currently used diagnostic tests (DME and FAT) for dog rabies / N.L. Miranda, C.G. Robles // *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. – 1991. – Vol. 22, № 1. – P. 46–50.
176. Moeschler, S. Quantification of Lyssavirus-Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudotype Particles / S. Moeschler, S. Locher, K.K. Conzelmann [et al.] // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8, № 9. – P. 254.
177. Moreira, B.L.C. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines / B.L.C. Moreira, L.A. Pereira, A.P.L. Gimenez [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2019. – Vol. 270. – P. 46–51.
178. Moreira, B.L.C. Inactivated rabies vaccines: Standardization of an *in vitro* assay for residual viable virus detection / B.L.C. Moreira, A.P.L. Gimenez, J.M.F. Inagaki [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2020. – Vol. 14, № 3. – P. e0008142.
179. Nagaraj, T. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques / T. Nagaraj, J.P. Vasanth, A. Desai [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2006. – Vol. 36, № 1. – P. 17–23.
180. Nie, J. Development of *in vitro* and *in vivo* rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system / J. Nie, X. Wu, J. Ma [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 42769.
181. Niezgodna, M. Standard operating procedure for the Direct Rapid Immunohistochemistry Test (DRIT) for the detection of rabies virus antigen / M. Niezgodna, Ch.E Rupprecht // *Natl. Lab. Train. Netw. Course. Dep. Heal. Hum. Serv. Cent. Disease Control Prev. Rabies section*. – 2006. – P. 1–16.

182. Nokireki, T. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland / T. Nokireki, N. Tammiranta, U.-M. Kokkonen [et al.] // *Transbound Emerg. Dis.* – 2018. – Vol. 65, № 3. – P. 593–596.

183. Patel, A.C. Molecular and immunogenic characterization of BHK-21 cell line adapted CVS-11 strain of rabies virus and future prospect in vaccination strategy / A.C. Patel, V. Upmanyu, S. Ramasamy [et al.] // *Virusdisease.* – 2015. – Vol. 26, № 4. – P. 288–296.

184. Perez, O. Production methods for rabies vaccine / O. Perez, C.C. Paolazzi // *J. of indust. microbiology and biotechnology.* – 1997. – Vol. 18. – P. 340–347.

185. Prem Kumar, A.A. Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification / A.A. Prem Kumar, K.R. Mani, C. Palaniappan [et al.] // *Microbes Infect.* – 2005. – Vol. 7, № 9–10. – P. 1110–1116.

186. Qin, Sh. A new recombinant rabies virus expressing a green fluorescent protein: A novel and fast approach to quantify virus neutralizing antibodies / Sh. Qin, D. Volokhov, E. Rodionova [et al.] // *Biologicals.* – 2019. – Vol. 59. – P. 56–61.

187. Quiambao, B.P. Immunogenicity and effectiveness of post-exposure rabies prophylaxis with a new chromatographically purified Vero-cell rabies vaccine (CPRV): a two-stage randomised clinical trial in the Philippines / B.P. Quiambao, J. Lang, S. Vital [et al.] // *Acta Tropica.* – 2000. – Vol. 75, № 1. – P. 39–52.

188. Ramsden, R.O. Studies on the oral infectivity of rabies virus in carnivore / R.O. Ramsden, D.H. Johnston // *J. Wildl. Dis.* – 1975. – Vol. 11, № 3. – P. 318–324.

189. Reid, G.G. Comparison of electron microscopic techniques for enumeration of endogenous retrovirus in mouse and Chinese hamster cell lines used for production of biologics / G.G. Reid, E.W. Milne, L.W. Coggins [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2003. – Vol. 108, № 1. – P. 91–96.

190. Rourou, S. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media / S. Rourou, M. Ben Zakkour, H. Kallel // *Vaccine.* – 2019. – Vol. 37, № 47. – P. 6987–6995.

191. Rupprecht, Ch.E. Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention / Ch.E. Rupprecht, Th. Nagarajan. – Academic Press, 2015. – Vol. 2. – 366 p.
192. Rupprecht, Ch.E. Demonstration of Lyssavirus antigens by flow cytometry / Ch.E. Rupprecht, A.R. Fooks, B. Abela-Ridder // In: Laboratory techniques in rabies. 5 th ed., p. 1. – Geneva: WHO, 2018. – P. 169–175.
193. Rupprecht, Ch.E. The fluorescent antibody virus neutralization test / Ch.E. Rupprecht, A.R. Fooks, B. Abela-Ridder // In: Laboratory techniques in rabies. 5 th ed., p. 1. – Geneva: WHO, 2018. – P. 219–231.
194. Rupprecht, Ch.E. Rabies re-examined / Ch.E. Rupprecht, C.A. Hanlon, T. Hemachudha // The Lancet Infect. Dis. – 2002. – Vol. 2, № 6. – P. 327–343.
195. Saengseesom, W. Use of latex agglutination test to determine rabies antibodies in production of rabies antisera in horses / W. Saengseesom, S. Kasempimolporn, S. Akesowan [et al.] // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. – 2010. – Vol. 41, № 6. – P. 1387–1392.
196. Salvi, N.C. Validation of Indirect ELISA for Quantitative Testing of Rabies Antibodies During Production of Antirabies Serum using Equines / N.C. Salvi, R.L. Deopurkar, A.B. Waghmare [et al.] // Procedia in Vaccinology. – 2010. – Vol. 2, № 1. – P. 3–11.
197. Saxena, S.N. Evaluation of the new rapid rabies immunodiagnosis technique / S.N. Saxena, S.N. Madhusudana, K.K. Tripathi [et al.] // Indian J. Med. Res. – 1989. – Vol. 89. – P. 445–448.
198. Sekar, T. Quantification of Rabies Virus by Real Time PCR in comparison with Mouse Inoculation Test (MIT) and Fluorescent Antibody Test (FAT) / T. Sekar, A.A. Premkumar, G.C. Mohan [et al.] // Madridge J. Vaccines. – 2019. – Vol. 3, № 1. – P. 80–85.
199. Servat, A. Inter-laboratory trial to evaluate the reproducibility of a new ELISA to detect rabies antibodies in vaccinated domestic and wild carnivores / A. Servat, A. Labadie, A. Hamen [et al.] // Biologicals. – 2008. – Vol. 36. – P. 19–26.

200. Shankar, B.P. Advances in diagnosis of rabies / B.P. Shankar // *Veterinary World*. – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 74–78.
201. Shiota, S. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies / S. Shiota, K. Mannen, T. Matsumoto [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2009. – Vol. 161, № 1. – P. 58–62.
202. Silva, G.H. Performance evaluation of the polyclonal anti-rabies virus ribonucleoprotein IgG antibodies produced in-house for use in direct fluorescent antibody test / G.H. Silva, J.H.S. Silva, K. Iamamoto [et al.] // *J. Virol. Methods*. – 2020. – Vol. 280. – P. 113879.
203. Silva, L.H.Q. Comparison between the Counter Immunoelectrophoresis Test and Mouse Neutralization Test for the Detection of Antibodies against Rabies Virus in Dog Sera / L.H.Q. Silva, C.E. Bissoto, Cr. Carvalho [et al.] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. – 2002. – Vol. 97, № 2. – P. 259–261.
204. Sipahioğlu, U. Transplacental rabies in humans / U. Sipahioğlu, S. Alpaut // *Mikrobiyol Bul.* – 1985. – Vol. 19, № 2. – P. 95–99.
205. Smith, J.S. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody / J.S. Smith, P.A. Yager, G.M. Baer // In: *Laboratory techniques in rabies*. 4 th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 181–191.
206. Sokol, F. Structural proteins of rabies virus / F. Sokol, D. Stanček, H. Koprowski // *J. Virol.* – 1971. – Vol. 7, № 2. – P. 241–249.
207. Srinivasan, A. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients / A. Srinivasan, E.C. Burton, M.J. Kuehnert [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. – 2005. – Vol. 352, № 11. – P. 1103–1111.
208. Stantic-Pavlinic, M. Vaccination against rabies and protective antibodies – comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays / M. Stantic-Pavlinic, P. Hostnik, S. Levicnik-Stežinar [et al.] // *Veterinarski Arhiv*. – 2006. – Vol. 76, № 4. – P. 281–289.
209. Sudarshan, M.K. An immunogenicity, safety and post-marketing surveillance of a novel adsorbed human diploid cell rabies vaccine (Rabivax) in Indian sub-

jects / M.K. Sudarshan, S. Bhardwaj, B.J. Mahendra [et al.] // *Hum. Vaccin.* – 2008. – Vol. 4, № 4. – P. 275–279.

210. Superti, F. Mechanism of rabies virus entry into CER cells / F. Superti, M. Derer, H. Tsiang // *J. Gen. Virol.* – 1984. – Vol. 65. – P. 781–789.

211. Tao, X. Molecular characterization of China human rabies vaccine strains / X. Tao, N. Han, Z. Guo [et al.] // *Virol. Sin.* – 2013. – Vol. 28, № 2. – P. 116–123.

212. Timiryasova, T.M. Preparation and qualification of internal rabies reference standards for use in the rabies rapid fluorescent focus inhibition test / T.M. Timiryasova, S.A. Hodge, L. Zheng [et al.] // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 9893.

213. Timiryasova, T.M. Rapid fluorescent focus inhibition test optimization and validation: Improved detection of neutralizing antibodies to rabies virus / T.M. Timiryasova, P. Luo, L. Zheng [et al.] // *J. Immunol. Methods.* – 2019. – Vol. 474. – P. 112626.

214. Um, J. Development and evaluation of an anti-rabies virus phosphoprotein-specific monoclonal antibody for detection of rabies neutralizing antibodies using RFFIT / J. Um, B.C. Chun, Y.S. Lee [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2017. – Vol. 11, № 12. – P. e0006084.

215. Vengatesan, D. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry / D. Vengatesan, G.D. Raj, A. Raja [et al.] // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry.* – 2006. – Vol. 70B. – P. 335–343.

216. Vora, N.M. Raccoon rabies virus variant transmission through solid organ transplantation / N.M. Vora, S.V. Basavaraju, K.A. Feldman [et al.] // *JAMA.* – 2013. – Vol. 310, № 4. – P. 398–407.

217. Wang, H. A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody / H. Wang, N. Feng, S. Yang [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2010. – Vol. 170, № 1–2. – P. 80–85.

218. Wasniewski, M. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores / M.

Wasniewski, A. Labbe, L. Tribout [et al.] // *J. Virol. Methods.* – 2014. – Vol. 195. – P. 211–220.

219. Webster, L.T. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test / L.T. Webster, J.R. Dawson // *Exp. Biol. Med.* – 1935. – Vol. 32, № 4. – P. 570–573.

220. World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. WHO technical report Series 1024. – Geneva: WHO, 2020. – 227 p.

221. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 982. – Geneva: WHO, 2013. – 139 p.

222. World Health Organization Expert Consultation on Rabies. WHO technical report Series 1012. – Geneva: WHO, 2018. – 183 p.

223. Wunner, W.H. The molecular biology of rabies viruses / W.H. Wunner, J.K. Larson, B. Dietzschold [et al.] // *Reviews of Infectious Diseases.* – 1988. – Vol. 10, № 4. – P. 771–784.

224. Yager, M.L. The rapid fluorescent focus inhibition test / M.L. Yager, S.M. Moore // In: *Current laboratory techniques in rabies diagnosis, research and prevention.* Vol. 2. – San Diego: Elsevier Academic Press, 2015. – P. 199–215.

225. Yanling, L. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit for detecting human anti-rabies virus antibody / L. Yanling, W. Jingshuang, W. Huixin [et al.] // Patent № 104076146 CN, G01N33/531; 2014.

226. Zhu, S. Sequencing and molecular characterization of CTNCEC25, a China fixed rabies virus vaccine strain CTN-1 adapted to primary chicken embryo cells / S. Zhu, C. Wang, P. Zhang [et al.] // *Virol. J.* – 2014. – Vol. 11. – P. 176.