

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ю.К.Гаврилова, С.В.Генералов, М.Н.Киреев, Н.А.Шарапова¹, Е.Г.Абрамова, Л.В.Савицкая, М.В.Овчинникова, Т.Ю.Кириллова, А.П.Семакова

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ К РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНУ АТТЕНУИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Выделение рибонуклеопротеина (РНП) аттенуированного вируса бешенства с последующей разработкой схем иммунизации животных препаратами на его основе и установлением наиболее эффективной схемы, позволяющей получить сыворотку с высоким титром антител к РНП. *Материалы и методы.* В работе использовали перевиваемую клеточную линию Vero, штамм вируса бешенства «Москва 3253_{vero}», адаптированный к репродукции на клетках Vero, кроликов породы шиншилла. С целью получения сывороток, содержащих антитела к РНП вируса бешенства, предложены экспериментальные схемы иммунизации животных РНП, в том числе и с адъювантами: полиоксидонием и коллоидным золотом. Динамика накопления антител к РНП вируса бешенства в сыворотке крови подопытных животных исследована методом дот-иммуноанализа. *Результаты.* Целевой компонент (РНП вируса бешенства) выделяли непосредственно из цитоплазмы инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры Vero по модифицированному методу M. Dastkhosh (2014), лиофильно высушивали и использовали при разработке препаратов для иммунизации животных-продуцентов. При исследовании динамики образования антител к РНП вируса бешенства методом дот-иммуноанализа установлена эффективность действия адъюванта — наночастиц коллоидного золота размером от 15 до 17 нм, применение которого позволяет увеличить титр антител в 2 раза. *Заключение.* Полученные результаты представляют интерес для дальнейших исследований, связанных с конструированием диагностических препаратов и разработкой методических приемов с использованием подобных препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 5, С. 3—8

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, рибонуклеопротеин, схема иммунизации, иммунные сыворотки, антитела к рибонуклеопротеину, антирабический иммуноглобулин

Yu.K.Gavrilova, S.V.Generalov, M.N.Kireev, N.A.Sharapova, E.G.Abramova, L.V.Savitskaya, M.V.Ovchinnikova, T.Yu.Kirillova, A.P.Semakova

DEVELOPMENT OF THE SCHEME OF OBTAINING ANTIBODIES TO THE RIBONUCLEOPROTEIN OF ATTENUATED RABIES VIRUS

Russian Research Institute for Plague Control «Microb», Saratov, Russia

Aim. Isolation of ribonucleoprotein (RNP) of an attenuated rabies virus, develop schemes for immunizing animals with RNP-based preparations and determine the most effective scheme that allows obtaining serum with a high antibody titer to the RNP. *Materials and methods.* We used the transplantable cell line Vero, the strain rabies virus «Moscow 3253_{vero}», adapted for reproduction on Vero, rabbits of the chinchilla breed. In order to obtain serums containing antibodies to the RNP of the rabies virus, experimental schemes have been proposed for immunizing animals with RNP, including with adjuvants: polyoxidonium and colloidal gold. The dynamics of the accumulation of antibodies to the RNP of the rabies virus in the blood serum of experimental animals was studied by dot-immunoassay. *Results.* The target component (RNP of

the rabies virus) was isolated directly from the cytoplasm of the Vero cell culture infected with the rabies virus according to the modified M. Dastkhosh (2014) method, lyophilized and used in the development of preparations for immunizing experimental animals. In the study of the dynamics of the formation of antibodies to RNP of the rabies virus by the method of dot-immunoassay, the effectiveness of an adjuvant is established — colloidal gold nanoparticles ranging in size from 15 to 17 nm, the use of which makes it possible to increase the antibody titer by 2 times. *Conclusion.* The results obtained are of interest for further research related to the design of diagnostic products and the development of methodological techniques using such preparations.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 5, P. 3—8

Key words: rabies, rabies virus, ribonucleoprotein, immunization schedule, immune sera, antibodies to ribonucleoprotein, anti-rabies immunoglobulin

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство, характеризующееся безрезультативностью лечения инфекции при появлении первых клинических симптомов и, как следствие, абсолютной летальностью, в настоящее время представляет проблему для многих государств мира [15]. Важную роль в предупреждении развития данного заболевания играет своевременное принятие мер экстренной профилактики, а также выявление случаев инфицирования вирусом бешенства с помощью современных лабораторных методов. Для оценки титра антител к вирусу бешенства в сыворотке крови иммунизированных животных, а также для выявления самого вируса, применяют методы, основанные на иммунофлуоресценции [7].

Среди рекомендованных экспертами ВОЗ методов определения титра антител к вирусу бешенства в материале особое место занимает реакция нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре с применением флуоресцирующих антител, которая также известна, как FAVN тест (fluorescent antibody virus neutralization test) [15]. Многочисленные исследования свидетельствуют об успешном использовании различных модификаций данного теста при оценке содержания специфических антител в материале. Основные отличия существующих модификаций состоят в применении различных клеточных линий и штаммов вируса бешенства [7, 10]. Для использования в производстве антирабического иммуноглобулина предложена модификация FAVN теста с применением перевиваемой клеточной линии Vero и штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}» [3].

При постановке реакции нейтрализации на клеточной культуре окрашивание проводят с применением флуоресцирующих конъюгатов на основе антител, полученных к вирусу бешенства [7, 10]. На наш взгляд, более эффективным является выявление не цельного вируса, а его компонента — рибонуклеопротеина (РНП), содержащегося в цитоплазме инфицированной клетки на этапе сборки вирусной частицы. Такой подход позволит сократить время проведения анализа. Более того, применение антител к РНП вируса бешенства оправдано и при конструировании других диагностических наборов, например, для иммуноферментного анализа [6].

Целью данного исследования явилась разработка эффективной схемы получения сыворотки, содержащей специфические антитела к РНП штамма вируса бешенства «Москва 3253_{Vero}».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки (*Vero*), используемая в работе, была получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия) и про-

верена на отсутствие микоплазм. Клетки Vero культивировали в течение трёх суток стационарным методом на культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 75 см² («Orange Scientific», Бельгия) с применением питательной среды Игла MEM с 10 % сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия) в CO₂ инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония).

В работе использовали аттенуированный штамм вируса бешенства «Москва 3253_{vero}» (получен из НЦЭСМП, Москва, Россия), адаптированный к росту на клеточной культуре Vero [1]. РНП из инфицированной вирусом бешенства клеточной культуры Vero выделяли по модифицированному методу M. Dastkhosh [12]. В основу метода положен принцип извлечения РНП непосредственно из содержимого инфицированной клетки на ранних этапах репродукции вируса. В суспензию клеток Vero вносили вирусосодержащую жидкость в дозе 0,1-1,0 ИД₅₀ на клетку. Выращивание вируса бешенства на культуре Vero осуществляли в условиях, аналогичных условиям для культивирования неинфицированной клеточной линии. Культуру клеток собирали и инкубировали в течение 30 мин при 56⁰С на водяной бане для инактивации вируса бешенства, затем клетки осаждали центрифугированием при ускорении 900 g в течение 10 минут и двукратно промывали 0,9% раствором хлорида натрия. Для осуществления клеточного лизиса полученный осадок суспендировали в ледяной деионизованной воде с 0,2 мМ фенолметилсульфонилфлуорида (AppliChem), инкубировали в холодильнике в ёмкости со льдом в течение 1 ч, после чего клетки и клеточный детрит осаждали на центрифуге Sigma 2K15 (Германия) в течение 20 минут при ускорении 1000 g и температуре 4⁰С. Процедуру лизиса клеток с последующим центрифугированием проводили двукратно. Полученную надосадочную жидкость, содержащую РНП, собирали и высушивали на лиофильной установке Alpha-1-5 (Германия) в течение 8 часов. Полученный лиофилизат РНП использовали для иммунизации кроликов породы шиншилла обоего пола, массой от 1,5 до 2,5 кг.

С целью получения материала для иммунизации РНП вируса бешенства растворяли в деионизованной воде до концентрации 400 мкг/мл, при необходимости добавляли адъювант, а затем внутримышечно вводили подопытным животным на 0, 43 и 57 сут от начала иммунизации. Материал для иммунизации готовили за 1,5-2 ч до введения и хранили при температуре 5-8⁰С, за 30 мин до введения животным выдерживали при комнатной температуре. В качестве адъювантов использовали полиоксидоний (лиофилизат, ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) и раствор коллоидного золота с размером частиц от 15 до 17 нм, который получали по стандартной методике [14].

Процедуры взятия образцов крови из краевой ушной вены, а также тотального обескровливания экспериментальных животных осуществляли с соблюдением принципов биоэтики [5]. При выполнении тотального обескровливания применяли препараты ксила (Interchemie werken «De Adelaar» B.V. Нидерланды) и золетил (Virbac, Франция).

Собранную от различных экспериментальных групп сыворотку крови выдерживали в течение месяца при 4-8 °С, после чего проводили исследование показателя активности сывороток in vitro в дот-иммуноанализе [8]. При хранении в качестве консерванта использовали раствор хинозола в концентрации 0,5 мл на 100 мл сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом работы явилась задача получения РНП вируса бешенства. Особенностью РНП является сложность его выделения непосредственно из вирусных частиц. Более эффективным подходом является его выделение из цитоплазмы

клеток, в которых происходит репродукция вируса бешенства. Выбранный способ получения РНП является простым в исполнении и в наименьшей степени влияет на его структурную целостность, от которой зависят биологические и иммунологические функции указанной субъединицы [12]. Следует отметить, что оптимальное время культивирования используемого в работе штамма вируса бешенства на клетках Vero с целью получения РНП составило (72 ± 4) ч. Изменение сроков выращивания инфицированной вирусом культуры клеток приводило к уменьшению выхода РНП. Выход РНП с монослойной клеточной культуры, содержащей $(2,8 \pm 0,4) \times 10^6$ клеток, составил $0,18 \pm 0,02$ мг/мл. Лиофильно высушенный РНП представлял собой белый порошок, хорошо растворимый в воде. Образцы РНП являлись электрофоретически однородными, примеси отсутствовали. Молекулярная масса соответствовала 55 кДа.

На следующем этапе работы выполняли иммунизацию кроликов раствором РНП с целью получения антител к нему. Выбор схем иммунизации животных обусловлен опытом отечественных и зарубежных исследователей [6, 11]. С целью повышения активности сывороток к РНП в качестве адъювантов использовали полиоксидоний и наночастицы коллоидного золота.

Иммуноадъювантное действие полиоксидония ранее было доказано при его совместном введении с антирабической вакциной, проявляющееся в усилении ее протективных свойств и увеличении выживаемости животных при их инфицировании [2]. Отмечено также усиление антителообразования в ответ на введение кроликам инактивированного аттенуированного вируса бешенства вместе с полиоксидонием [4].

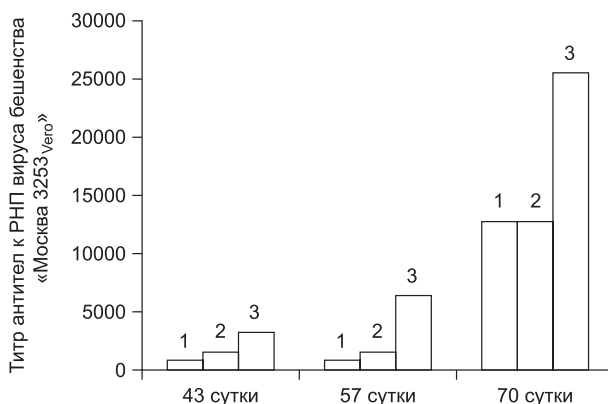
Применение металлов, в том числе золота, в виде наноразмерных частиц в качестве адъювантов противовирусных вакцин также обосновано результатами отечественных и зарубежных исследователей [9, 13]. При этом рекомендуемый средний размер золотых наночастиц составляет 15 либо 50 нм [13]. В настоящей работе использовали раствор коллоидного золота с размером частиц от 15 до 17 нм.

Исследование антителообразования проводили на трех группах, каждая из которых включала 3 животных. Первую группу иммунизировали раствором РНП без добавления адъювантов (дозировка — 400 мкг РНП), вторую и третью — с адъювантами: полиоксидоний (дозировка — 1 мг полиоксидония, 400 мкг РНП) и раствор коллоидного золота соответственно (дозировка — 0,5 мл раствора наночастиц коллоидного золота, 400 мкг РНП). Конечный объем материала, вводимого подопытным животным, составлял 1 мл.

Для исследования динамики накопления антител в крови экспериментальных животных на 43 и 57 дни эксперимента у животных каждой экспериментальной группы брали образцы крови из краевой вены уха.

На 70 день эксперимента осуществляли процедуру тотального обескровливания подопытных животных с применением лекарственных препаратов ксила и золетил. Оба препарата принадлежат к 3 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76. Препарат ксила оказывает миорелаксационный, седативный и анальгезирующий эффект. Данный препарат вводили подопытным животным в концентрации 0,15 мл/кг. Золетил представляет собой комплексный анестетик, оказывает анксиолитическое, седативное действие, расслабление скелетной мускулатуры. Введение препарата подопытным животным осуществляли в концентрации 0,1 мл/кг. Комплекс препаратов ксила и золетил, взятых в соответствии с массой подопытного животного, доводили 0,9% физиологическим раствором до объема 1,5 мл и вводили животным в краевую вену уха. Эффект от введения препаратов наблюдали через 10-20 с после инъекции.

Титр антител к РНП в собранных сыворотках устанавливали в дот-иммуноанализе с применением антигенного диагностикума с наночастицами коллоидного золота. При исследовании образцов крови животных из всех экспериментальных групп был подтвержден факт образования антител к РНП. Наибольший титр установлен в группе животных, иммунизированных РНП в сочетании с золотыми наночастицами. К 43 дню исследования титр антител к РНП составлял 1:3200, что превышало значения титра антител в сыворотках, полученных от животных 1 и 2 групп, в 4 и 2 раза соответственно. Аналогичная тенденция сохранялась до конца эксперимента. К 70 дню исследования титр антител в сыворотках, полученных от животных, иммунизированных РНП с наночастицами золота, составил 1:25 600 и являлся наибольшим по сравнению с титрами антител сывороток, полученных от животных остальных экспериментальных групп (рис.).



Титр антител к РНП вируса бешенства в образцах сыворотки крови животных трех экспериментальных групп на 43, 57 и 70 сутки от начала иммунизации.

1 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}»; 2 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}» в комплексе с адьювантом (полиоксидоний); 3 — группа животных, иммунизированных РНП вируса бешенства штамма «Москва 3253_{vero}» в комплексе с адьювантом (наночастицы коллоидного золота 0,1 моль/л)

Таким образом, в результате исследования предложена эффективная схема получения антител к РНП вируса бешенства, включающая этапы получения антигена, приготовления на его основе препаратов для иммунизации животных-продуктов с последующим проведением иммунизационных мероприятий и выявления эффективной схемы иммунизации, позволяющей получить наибольший титр антител к РНП в сыворотках крови животных. Особенностью этапа получения антигена является культивирование вируса бешенства на клеточной культуре Vero в течение 72 ч в условиях CO₂ инкубатора (37 °C и 5% CO₂), непосредственное выделение нативного РНП из инфицированной клеточной культуры и его лиофильное высушивание. В ходе эксперимента было установлено, что наиболее эффективной является схема иммунизации животных РНП в сочетании с наночастицами коллоидного золота размером от 15 до 17 нм. При этом следует отметить и положительный эффект использования в качестве адьюванта полиоксидония на образование антител к РНП.

Полученные результаты представляют интерес для дальнейших исследований, связанных с конструированием диагностических препаратов для исследования биологического материала на содержание вируса бешенства и антител к нему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В. и др. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. Проблемы особо опасных инфекций. 2016, 2: 95-101.
2. Авдеева Ж.И., Алпатов Н.А., Акользина С.Е. и др. Иммуноадьювантный эффект цитокинов. Тихоокеанский мед. журнал. 2009, 3: 19-22.

3. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г. и др. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. Биотехнология. 2018, 4 (34): 83-88.
4. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В. и др. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 2 (112): 78-81.
5. Германчук В.Г., Семакова А.П., Шавина Н.Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I-II групп. Проблемы особо опасных инфекций. 2018, 4: 33-38.
6. Сухарьков А.Ю., Назаров Н.А., Метлин А.Е. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. Ветеринария Кубани. 2011, 6: 12-14.
7. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А. и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). Гены и клетки. 2014, 3 (9): 276-280.
8. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Проблемы особо опасных инфекций. 2010, 103(1): 63-66.
9. Asgary V., Shoari A., Baghbani-Arani F. et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine. Int. J. Nanomedicine. 2016, 11: 3597-3605.
10. Bedekovic T., Lemo N., Lojic I. et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. Journal of Virological Methods. 2013, 189: 204-208.
11. Caporale G.M.M., Silva A. de C.R., Peixoto Z.M.P. et al. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. Journal of clinical laboratory analysis. 2009, 23: 7-13.
12. Dastkhosh M., Rahimi P., Haghighat S. et al. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein. Jundishapur journal of microbiology. 2014, 7(9): 1-4.
13. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Immunological properties of gold nanoparticles. Chem. Sci. 2017, (8): 1719-1735.
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in minodisperse gold suspension. Nat. Phys. Sci. 1973, 241(105): 20-21.
15. WHO Expert Consultation on Rabies: third report. WHO technical report series 1012. Geneva, Switzerland. 2018.

Поступила 07.05.19

Контактная информация: Гаврилова Юлия Кирилловна,
410005, Саратов, ул. Университетская, 46, р.т. (8452) 26-21-31

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

О.С.Бондарева, Г.А.Ткаченко, М.Л.Леденева, А.А.Батулин, Л.В.Лемасова, И.М.Шпак, А.А.Будченко

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ САПА НА ОСНОВЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ЧИСЛА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Разработка сокращенной схемы MLVA-типирования возбудителя сапа и оценка возможности ее применения для дифференциации штаммов *B. mallei* и изучения их генетического полиморфизма. *Материалы и методы.* Объектами исследования служили 14 штаммов *Burkholderia mallei* из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и 12