

УДК 615.4:578.74

Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции

© 2018 Ю.К. ГАВРИЛОВА^{1,*}, С.В. ГЕНЕРАЛОВ¹, Е.Г. АБРАМОВА¹, Л.В. САВИЦКАЯ¹, М.В. ГАЛКИНА¹, А.В. КОЧКИН¹

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005 Саратов

*e-mail: ylia-93@list.ru

Поступила 07.06.2018 г.

Принята в печать 29.06.2018 г.

Усовершенствован метод определения уровня содержания антител к вирусу бешенства путем использования аттенуированного штамма вируса бешенства Москва 3253 и клеточных культур *Vero* и *VHK-21* в реакции иммунофлуоресценции. Культура клеток *Vero* представляется предпочтительной. Учет результатов осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа. Особенностью метода является использование штамма фиксированного вируса бешенства Москва 3253. Установлена высокая степень корреляции разработанного метода с классическим тестом – реакцией нейтрализации вируса бешенства на белых мышах. Результат данной работы позволил значительно сократить время проведения анализа, а также свести к минимуму количество животных, необходимых для контроля биологических свойств препарата антирабического иммуноглобулина. Метод рекомендуется к применению для проведения контрольных тестов на этапах производства, связанных с иммунизацией лошадей-продуцентов и получением антирабической сыворотки, а также для контроля специфической активности готового препарата.

Ключевые слова: бешенство, вирус бешенства, реакция нейтрализации, иммунофлуоресценция, культура клеток, антирабический иммуноглобулин, специфическая активность.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88

Бешенство – остропротекающее смертельное вирусное заболевание, которому подвержены все теплокровные животные и человек [1, 2]. Ежегодно в мире от бешенства погибает от 40 до 70 тыс. человек [3]. Главным путем заражения человека вирусом бешенства является контакт с больным животным, а именно укусы или ослюнение поврежденных кожных покровов и слизистых оболочек [2].

В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, отмечается тенденция к увеличению числа неблагополучных по бешенству регионов [4–6]. В лечебно-профилактические учреждения РФ ежегодно обращается до 470 тыс. пострадавших от укусов животных, более половины из них проходит курс специфического антирабического

Список сокращений: АИГ – антирабический иммуноглобулин; ИФА – иммуноферментный анализ; КРС – крупный рогатый скот; МЕ – международные единицы; МФА – метод флуоресцирующих антител; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РДП – реакция диффузной преципитации; РНВБк – реакция нейтрализации вируса бешенства на культуре клеток; РНВБм – реакция нейтрализации вируса бешенства на белых мышах; РНГА – реакция непрямого гемагглютинации; РТГА – реакция торможения гемагглютинации; РГА – реакция гемагглютинации; РСК – реакция связывания комплекта; ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат; ED₅₀ – защитный титр иммуноглобулина (сыворотки), предотвращающий развитие инфекции в 50% клеточных популяций (лунок с клеточным монослоем); FAVN (fluorescent antibody virus neutralization) – метод определения вируснейтрализующих антител с использованием иммунофлуоресценции; ID₅₀ – инфицирующая доза вирусосодержащей жидкости, вызывающей развитие инфекции в 50% клеточных популяций (лунок с клеточным монослоем).

лечения [5]. Из-за абсолютной летальности бешенства вопросы постэкспозиционной профилактики заболевания имеют исключительно важное значение. Существует единая мировая тактика профилактики заболевания после контакта с бешеными или подозрительными на бешенство животными, заключающаяся в немедленной местной обработке раны с последующим введением концентрированной культуральной антирабической вакцины, а при укусах опасной локализации – в комбинации с антирабическим иммуноглобулином. В настоящее время гетерологичный антирабический иммуноглобулин, выпускаемый РосНИПЧИ «Микроб», остается единственным отечественным зарегистрированным лекарственным средством пассивной иммунизации, применяемым для минимизации риска заболевания людей бешенством при укусах опасной локализации [7].

Одним из показателей качества препарата антирабического иммуноглобулина является его специфическая активность. Исследование указанного показателя отличается трудоемкостью, поскольку подразумевает интрацеребральное введение смеси вирусосодержащей жидкости и антирабического иммуноглобулина белым мышам. Результат теста учитывают в течение 14 дней. Благодаря своей специфичности и чувствительности РНВБм остается классическим тестом при определении активности антирабического иммуноглобулина. Существенным ограничением метода считается невозможность проведения анализа множества образцов одновременно из-за участия в нем большого количества животных и длительности получения результатов. Более того, ВОЗ рекомендует разработку и поиск альтернативных методов контроля без использования животных [8].

Для исследования материала, содержащего вирус бешенства или антирабические антитела, известны такие методы *in vitro*, как анализ цитопатического действия, РДП, РНГА, РТГА, РГА, РСК, тест бляшкообразования, МФА, различные модификации ИФА, дот-гибридизация, ПЦР, метод проточной цитометрии, тест ингибирования фокусов флуоресценции, FAVN-тест.

Методы *in vitro* различаются возможностью выявления живого или инактивированного вируса бешенства и его компонентов, особенностями учета результата, уровнем чувствительности и специфичности, продолжительностью анализа. Методы *in vitro* дают возможность получить результат в короткие сроки без использования лабораторных животных. ВОЗ и Всемирная организация здоровья животных в качестве

метода определения уровня вируснейтрализующих антирабических антител *in vitro* рекомендует использовать FAVN-тест с применением штамма вируса бешенства CVS-11 и клеточной культуры *BHK-21* [9]. Указанным методом, как правило, оценивают поствакцинальный иммунитет у животных.

Актуальным является расширение спектра штаммов вируса бешенства, которые можно применить на практике для определения уровня антирабических антител. В настоящее время известны различные вариации метода иммунофлуоресценции для обнаружения вируса бешенства и антирабических антител [10], в том числе с применением клеточных культур и штаммов вируса, отличающихся от рекомендованных ВОЗ [11–13]. Для указанной цели применяют культуры клеток *MDBK*, *MDCK* [11], *HGUK-1* [12], почки сайги [13] и штаммы вируса бешенства ВНИИЗЖ [11], Овечий ГНКИ [12], ТС-80 [13]. Метод обнаружения вируса бешенства в клетках *HGUK-1* [12] рекомендован для включения в соответствующие разделы ГОСТ для ускоренной диагностики бешенства. Метод иммунофлуоресценции с использованием штамма ТС-80 и культуры клеток почки сайги применяется для контроля на этапах производства антирабической вакцины [13]. Таким образом, методы иммунофлуоресценции с использованием отличающихся от рекомендованных ВОЗ штаммов вируса бешенства и клеточных культур уже находят практическое применение.

Цель настоящего исследования – модификация ускоренного метода иммунофлуоресценции для определения специфической вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с применением аттенуированного штамма вируса бешенства Москва 3253 и клеточных культур *Vero* и *BHK-21*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Клеточные линии *Vero* (клетки почки африканской зеленой мартышки) и *BHK-21* (клетки почки сирийского хомяка) получены из коллекции ООО «Биолот» (Россия). Обе культуры предварительно были исследованы на отсутствие микоплазм. Культивирование клеточных культур осуществляли на среде Игла MEM («Биолот») с добавлением 10%-ной сыворотки КРС («Биолот»).

Фиксированные штаммы вируса бешенства Москва 3253 (номер депозита 61/91, пассаж 3) и CVS (номер депозита 80/06, пассаж 3) были

получены из ФГБУ НЦЭСМП (Москва). Для выполнения данной работы использовали штамм Москва 3253, адаптированный к репродукции в клетках *Vero* [14]. При культивировании вируса в клетках *Vero* и *BHK-21* использовали среду Игла MEM или среду 199 («Биолот») с добавлением 5%-ной сыворотки КРС. Штамм вируса бешенства CVS использовали при определении активности сывороток и иммуноглобулина в РНВБм, которую выполняли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [9].

Вирус титровали в стерильных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах (Cellstar, Германия). В каждую лунку вносили по 150 мкл питательной среды, а затем – по 50 мкл вирусосодержащей жидкости, после чего в лунки добавляли по 50 мкл клеточной суспензии с концентрацией клеток $(3 \pm 1) \cdot 10^5$ кл/мл. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор (Sanyo, Япония) и инкубировали при 5% CO₂ и 37 °С, учет титра вируса проводили через 24, 48, 72 ч. После инкубации из лунок планшетов удаляли питательную среду, клеточный монослой фиксировали холодным (–20 °С) 80%-ным водным раствором ацетона в течение 10 мин при комнатной температуре [9]. И затем окрашивали диагностическим антирабическим иммуноглобулином, меченым ФИТЦ (ВНИИЗЖ, Россия). Результат учитывали с помощью инвертированного люминесцентного микроскопа «Микромед И-Люм» (Россия). Клеточный монослой считали инфицированным при обнаружении в лунке одной или нескольких флуоресцирующих клеток, свечение которых соответствовало 3 или 4 баллам. Расчет инфицирующих доз (lg ID₅₀) осуществляли по методу Рида и Менча при помощи компьютерной программы для анализа результатов РНВБм [15].

На основании данных титрования вируса в клеточной культуре готовили рабочие разведения вируса бешенства для определения специфической активности иммунных сывороток и антирабического иммуноглобулина в РНВБм *Vero* и *BHK-21*.

Разведения иммунных лошадиных сывороток и препарата антирабического иммуноглобулина выполняли в 96-луночных полистироловых планшетах на основе среды Игла MEM с добавлением 5%-ной или 10%-ной сыворотки КРС. К готовым разведениям добавляли рабочий раствор вируса бешенства штамма Москва 3253, адаптированного к росту на клеточной культуре *Vero*. Параллельно готовили планшет со следующими контрольными образцами: второй международный

стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства (2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human, дистрибьютор NIBSC, Поттерс Бар, Великобритания), рабочее разведение вируса, нормальная 2%-ная лошадиная сыворотка («Биолот»), интактная культура клеток. Помимо контрольных образцов, в этом же планшете титровали используемую в эксперименте вирусосодержащую жидкость. После добавления к экспериментальным образцам раствора с рабочим разведением вируса планшеты с экспериментальными и контрольными образцами инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и затем во все лунки планшетов вносили по 50 мкл суспензии клеточной культуры с концентрацией клеток $(3 \pm 1) \cdot 10^5$ кл/мл. Планшеты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в воздухе в течение 72 ч. Дальнейшие фиксацию клеток, окрашивание и учет результатов осуществляли так же, как и в экспериментах по исследованию активности вируса.

Исследуемые образцы сыворотки или иммуноглобулина тестировали в четырех лунках для каждого разведения. Специфическую активность антирабических препаратов определяли относительно активности международного образца специфической активности антирабического иммуноглобулина. В качестве образца сравнения использовали второй международный стандартный образец иммуноглобулина человеческого против бешенства с активностью 30 МЕ. Титр антител в образцах иммунных сывороток и антирабического иммуноглобулина, а также активность вируса бешенства рассчитывали по методу Рида и Менча [9]. Полученные данные сравнивали с результатами РНВБм. Наличие взаимосвязи между результатами определения специфической активности, полученными разными методами, оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для установления оптимального времени культивирования вируса образцы клеточных культур *Vero* и *BHK-21* с вирусом исследовали через каждые 24 ч в течение 3 сут (рис. 1). Через 24 ч с момента внесения вируса и начала инкубации в инфицированном монослое обеих клеточных культур наблюдали одиночные или небольшие группы клеток со специфическим свечением, которое визуальное оценивали на 1–2 балла, что было недостаточно для визуальной оценки и расчета титра вирусосодержащей жидкости. Через 48 и 72 ч от начала инкубации увеличивалось

количество фокусов флуоресценции, при этом интенсивность свечения инфицированных клеток возрастала до 3-4 баллов.

Следует отметить, что к 72 ч в клетках *Vero* происходило дальнейшее увеличение количества фокусов флуоресценции и общей площади инфицированных клеток в монослое. Для культуры клеток *BHK-21* к 72 ч инкубации отмечали частичное разрушение клеточного монослоя, что было характерно и для интактной культуры, которая являлась отрицательным контролем. Таким образом, при титровании вируса бешенства на клеточной культуре *Vero* рекомендуется учитывать результат через 72 ч, а при использовании клеточной культуры *BHK-21* – через 48 ч от начала инкубации. При этом в инфицированной культуре *Vero* отмечали большее количество фокусов флуоресценции по сравнению с культурой *BHK-21*, инфицированной аналогичными разведениями вируса. В ходе опытов выявлено, что оптимальное содержание сыворотки КРС в питательной среде при проведении анализа соответствует 5%.

Определение рабочей дозы вируса, необходимой для постановки РНВБк, осуществляли при взаимодействии вируса бешенства со стандартным образцом специфической активности АИГ. Установлено, что при рабочих разведениях виру-

са 100, 300, 500, 5000 ID₅₀/0,05 мл титры антител стандартного образца соответствовали значениям 3,38; 3,23; 2,6; 2,3 lg ED₅₀. При использовании рабочих разведений вируса более 5000 ID₅₀/0,05 мл специфические антитела обнаруживали в титре менее 2 lg ED₅₀, что заметно снижало чувствительность метода. При рабочих разведениях вируса менее 100 ID₅₀/0,05 не удалось установить конечную точку титрования стандартного образца специфической активности АИГ. Для оценки вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина использовали рабочее разведение вирусосодержащей жидкости, соответствующее значениям от 100 до 200 ID₅₀/0,05 мл. При учете результатов было зарегистрировано специфическое свечение в лунках с раститрованным вирусом, рабочим разведением вируса, смесью вируса и нормальной лошадиной сыворотки, что свидетельствовало о репродукции вируса бешенства в данных лунках. В образцах, представленных интактными клетками *Vero* (отрицательный контроль), фокусы флуоресценции не отмечены. Отсутствие свечения в лунках с разведениями антирабической сыворотки или иммуноглобулина, к которым добавляли рабочие разведения вируса, указывало на наличие специфических антител в данном разведении. Результаты анализа вируснейтрализующей активности исследуемых образцов приведены в табл. 1.

Исследования показали высокую степень соответствия полученных результатов при определении вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с помощью предлагаемого метода и реакции нейтрализации на белых мышах. Значение коэффициента корреляции Пирсона между результатами тестов *in vivo* и *in vitro* составило 0,9 [16]. При этом использование клеточной культуры *Vero* является предпочтительным, вследствие более высокой жизнеспособности клеточного монослоя в сравнении с культурой *BHK-21*.

Таким образом, в ходе исследований усовершенствован метод определения уровня содержания антител к вирусу бешенства в иммунных сыворотках и препарате гетерологичного иммуноглобулина в реакции иммунофлуоресценции с использованием перевиваемых клеточных культур *Vero* или *BHK-21*. Данная модификация метода FAVN может быть предложена для проведения контрольных исследований на этапе иммунизации продуцентов и получения иммунных сывороток при производстве антирабического

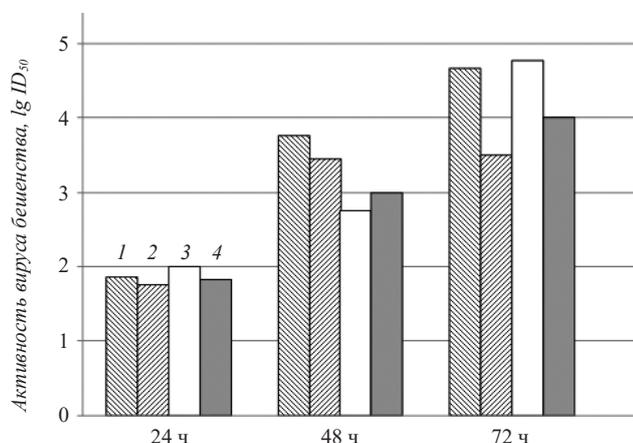


Рис. 1. Определение активности фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», адаптированного к росту в клетках перевиваемых клеточных линий: 1 - *Vero*, 3 - *BHK-21* (среда Игла MEM с 5% сыворотки КРС); 2 - *Vero*, 4 - *BHK-21* (среда Игла MEM с 10% сыворотки КРС)

Fig. 1. Analysis of activity of fixed rabies virus Moscow 3253 strain adapted to growth in continuous cell culture: (1), *Vero*, Eagle medium MEM with 5% bovine serum; (2), *Vero*, Eagle medium MEM with 10% bovine serum; (3), *BHK-21*, Eagle medium MEM with 5% bovine serum; (4), *BHK-21*, Eagle medium MEM with 10% bovine serum

Оценка активности антирабических сывороток и иммуноглобулина РНВБм (*in vivo*) и РНВБк (*in vitro*)

Assessment of anti-rabies sera and immunoglobulin activities by suggested method (*in vitro*) using reaction of neutralization on white mice (*in vivo*)

Исследуемые образцы	Титр		
	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>
	<i>Vero</i>	<i>ВНК-21</i>	
АИГ			
1	1:1279 (222)	1:1279 (222)	1:5468 (170)
2	1:1549 (269)	1:1279 (222)	1:6498 (202)
3	1:1862 (323)	1:1862 (323)	1:7173 (223)
4	1:1148 (199)	1:1148 (199)	1:5532 (172)
5	1:1862 (323)	1:1862 (323)	1:7784 (242)
6	1:1549 (269)	1:1549 (269)	1:6819 (212)
Иммунная сыворотка лошади			
1	1:129 (22)	1:100 (17)	1:566 (18)
2	1:100 (17)	1:100 (17)	1:512 (16)
3	1:100 (17)	1:100 (17)	1:400 (12)
Второй международный стандарт иммуноглобулина человеческого против бешенства	1:173 (30)		1: 965 (30)

Примечание: образцы АИГ (1–6) – пробы, отобранные из различных производственных серий АИГ; образцы иммунной сыворотки (1–3) – пробы антирабической сыворотки, полученные из крови отдельных лошадей-продуцентов; в скобках приведена активность исследуемых образцов в международных единицах (МЕ) относительно второго международного стандарта иммуноглобулина человека против бешенства.

иммуноглобулина, а также для контроля специфической активности готового препарата антирабического иммуноглобулина. Использование штамма фиксированного вируса бешенства Москва 3253 может упростить задачу внедрения предлагаемого метода в процесс производства антирабического иммуноглобулина благодаря доступности указанного штамма для предприятия изготовителя и сторонних организаций Российской Федерации, контролирующих качество лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заволока А.А., Заволока Ан.А. О бешенстве. *VetPharma*. 2013, 4(15), 24–31.
2. Макаров В.В. Бешенство. *Рос. вет. журн.*, 2017, (1), 28–34.
3. Ridder В.А. Human rabies: 2016 updates and call for data. *Weekly Epidemiol. record*, 2017, 92(7), 77–88.
4. Картавая С.А., Раичич С.Р., Симонова Е.Г. Бешенство в Российской Федерации: современная ситуация и эпидемиологические риски. *Эпидем. инфекцион. болезни. Актуальные вопросы*, 2016, (4), 4–8.

5. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002 – 2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, (3), 27–32. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32
6. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., и др. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации. *Рос. вет. журн.*, 2015, (4), 5–7.
7. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., и др. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2010, (3), 58–62.
8. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva, Switzerland, 2013, 139.
9. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, 4th ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1996, 476.
10. Bedekovic T., Lemo N., Lojkic I., et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test – Elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J. Virol. Meth.*, 2013, 189, 204–208. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.01.022

11. Баркова И.П., Нагиева Ф.Г., Никулина В.Г., Лисаков А.Н. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. *Инфекция иммунитет*, 2013, 4 (3), 323–326. doi: 10.15789/2220-7619-2013-4-323-326
12. Хисматулина Н.А., Гулюкин А.М., Шуралев Э.А., и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток нейринома Гассерова узла крысы (НГУК-1). *Гены и клетки*, 2014, 3(9), 276–280.
13. Вишняков И.Ф., Недосеков В.В., Груздев К.Н., и др. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител. Патент РФ 2130187. Оpubл. 10.05.1999.
14. 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. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101
15. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., и др. Программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2016617051. 23 июня 2016 г.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.

Express Analysis of Activity of Anti-Rabies Serum and Anti-Rabies Immunoglobulin in Cell Cultures by Immunofluorescence Method

Yu.K. GAVRILOVA^{1,*}, S.V. GENERALOV¹, E.G. ABRAMOVA¹, L.V. SAVITSKAYA¹, M.V. GALKINA¹, and A.V. KOCHKIN¹

¹Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 410005, Saratov, Russia

*e-mail: ylia-93@list.ru

Received June 07, 2018

Accepted June 29, 2018

The method for determining the level of antibodies to rabies virus (a fixed virus Moscow 3253 strain) in immune sera and a preparation of heterologous immunoglobulin by the immunofluorescence reaction in *Vero* or *BHK-21* cell cultures has been improved. The use of the *Vero* culture seems preferable. The results were recorded using a fluorescent microscope. A high degree of correlation of the developed with the classical method of neutralizing the rabies virus on white mice was established. The suggested method permitted to significantly reduce the time of control testing, and also minimize the number of test animals required for the analysis of the biological characteristics of the anti-rabies immunoglobulin preparation. The method is recommended for use in control tests at the stages of the anti-rabies immunoglobulin manufacturing associated with the immunization of producing horses and obtaining of rabies serum, as well as for monitoring the specific activity of the final product.

Key words: rabies, rabies virus, neutralization reaction, immunofluorescence, cell culture, anti-rabies immunoglobulin, specific activity

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88

Рег. № 1306 от 28.06.99 Выдано Госкомпечать России

Издатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика)
Москва, 117545, 1-ый Дорожный проезд, дом 1

Подписано в печать 29.08.2018 г. Формат бумаги 90 × 60
Бумага офсетная. Офсетная печать. Печ. л. 1,100 Уч.-изд. л. 6

Тираж 180 экз. Заказ № 47

Отпечатано с готового оригинала-макета в ООО «Линия Совершенства»
127473, г Москва, Никоновский пер., д. 3/1, помещение 2п, к.1