

На правах рукописи

ТИМИРГАЛЕЕВ
Руслан Владимирович

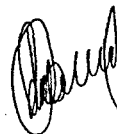


**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ВИРУСА БЕШЕНСТВА И ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология
03.00.07 - микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**



Казань – 2006

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

Научный руководитель: доктор биологических наук
Хисматуллина Наиля Анваровна

Научный консультант: доктор биологических наук
Гильмутдинов Рустам Якубович

Официальные оппоненты: -доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Раунс Госманович
-доктор ветеринарных наук, профессор
Фанзов Тагир Хадиевич

Ведущая организация: ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

Защита состоится «15» января 2007 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д – 220.034.01 при ФГОУ ВПО “Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана” (420074, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО “Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана”.

Автореферат разослан «14» декабря 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
профессор

 М.С. Ежкова

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бешенство – острое вирусное заболевание общее для животных и человека, характеризующееся признаками полиэнцефаломиелита с летальным исходом (Авилов В.М. и соавт., 1994; Селимов М.А., 1998; Груздев К.Н. и соавт., 2001).

Сложная эпидемиологическая и эпизоотическая ситуация по бешенству наблюдается более чем в 110 странах мира (Ведерников В.А. и др., 2005), от него ежегодно погибают свыше 50 -70 тыс. человек, более 1 млн. животных и эти цифры постоянно растут. В работах Н.А. Хисматуллиной, А.Н. Чернова, Р.Х. Юсупова и др. (1999-2006) установлено отличие степени патогенности эпизоотических изолятов, циркулирующих на территории Республики Татарстан, индекс инвазивности для которых колеблется в пределах 0,9-2,3. До сих пор, однако, не ясно, в каких отношениях находятся антигенные структуры гликопротеинового и нуклеопротеинового компонентов вакцинных штаммов и уличных изолятов рабического вируса.

В целом диагностические препараты на основе поликлональных антител, обеспечивая установление диагноза бешенства, не выявляют межштаммовые различия рабического вируса. Моноклональные антитела, обладая узкой специфичностью, позволяют идентифицировать штаммы рабического вируса, в частности, дифференцировать серотипы группы бешенства (Ботвинкин А.Д. и соавт., 1989-2004; Селимов М.А. и соавт., 1982-1998; Lafon M., 1996; Okoh A.E.J., 2000 и др.).

Не менее актуален вопрос контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных, в особенности диких плотоядных, при оральной иммунизации.

Традиционно используемая реакция вирусной нейтрализации для выявления антирабических антител в сыворотке крови и других биологических жидкостях (Webster L.T., Dawson J.R., 1935; Briggs D.J. et al., 1998) трудоемка и требует длительного наблюдения. Имеющиеся разработки

метода ИФА для ускоренного определения титра антирабических антител в сыворотках крови людей и животных (Ботвинкин А.Д. и соавт., 1986; Сазанова Э.Я. и соавт., 1991; Хисматуллина Н.А. и соавт., 1989, 2000; Barton L.D., Campbell J.B. 1988; Elmgren L.D., Wandeler A.I. 1996; Atanasiu P. et al., 1977; Nicholson K.G., Prestage H., 1982) не вышли за рамки лабораторных исследований.

В связи с вышеизложенным, перспективным направлением в диагностике бешенства является применение моноклональных антител, а для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства – метод ИФА.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилось усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител. Для достижения данной цели решались следующие задачи:

1. Разработать технологию получения моноклональных антител к глико- и нуклеопротеинам вируса бешенства для идентификации рабического вируса в патматериале.

2. Получить высокоактивный очищенный вирус бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, выделить его структурные белки (глико- и нуклеопротенны), использовать их в качестве иммуногенов, а гликопротеин также - для иммуноферментного анализа активности антирабических сывороток.

3. Разработать схему гипериммунизации белых мышей линии BALB/с антигеном вируса бешенства для получения спленоцитов, секретирующих специфические к нему антитела.

4. Получить гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к глико- и нуклеопротеинам вакцинного штамма «Овечий» ГНКИ рабического вируса, и изучить антигенное соответствие некоторых циркулирующих на территории Республики Татарстан эпизоотических изолятов вируса бешенства вакцинному штамму.

5. Изучить возможность применения гликопротеина вакцинного штамма вируса бешенства для выявления антирабических антител методом иммуоферментного анализа.

Научная новизна. На основании проведенных исследований впервые получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к возбудителю бешенства (штамм "Овечий" ГНКИ), и установлена возможность их применения в непрямом методе флуоресцирующих антител и сэндвич – варианте иммуоферментного анализа для выявления и идентификации возбудителя бешенства в патологическом материале. Показана возможность применения гликопротеина рабического вируса для выявления специфических антител в сыворотках крови животных, методом ИФА.

Практическая ценность. Установлена антигенная гомология эпизоотических изолятов, циркулирующих на территории Республики Татарстан, глико- и нуклеопротеинам вакцинного штамма вируса бешенства. Моноклональные антитела к глико- и нуклеопротеинам вируса бешенства рекомендуется использовать для идентификации возбудителя бешенства в патологическом материале. Выделенные структурные белки вируса бешенства (глико- и нуклеопротеины) могут быть применены в качестве антигенов для получения высокоспецифичных сывороток при создании более совершенных серологических тест-систем для диагностики и контроля вакцинопрофилактики бешенства.

На основании проведенных исследований разработаны и утверждены директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 2 инструкции и 1 наставление по применению.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на:

Ежегодных отчетных научных сессиях ФГНУ «ВНИВИ» - ФГУ «ФЦТРБ» по итогам НИР за 2001 – 2005 гг.; Международной научно-практической конференции, посвященной 45-летию создания ВНИИВВиМ

«Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов» (Покров, 2003); Международной научно-практической конференции, посвященной 60-летию факультета ветеринарной медицины УГСА «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» (Ульяновск, 2003); Всероссийской научно-практической конференции посвященной 45-летию ВНИВИ (Казань, 2005); Международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань, 2005); Всероссийской научно-практической конференции «Перспективы агропромышленного производства регионов России в условиях реализации приоритетного национального проекта «Развитие АПК» (Уфа, 2006).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

Основные положения диссертации, выдвигаемые на защиту:

1. Получение очищенного и концентрированного вируса бешенства и его основных структурных белков – глико- и нуклеопротеинов.
2. Оптимальная схема гипериммунизации белых мышей линии BALB/c антигеном вируса бешенства.
3. Идентификация эпизоотических изолятов вируса бешенства методами иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа на основе антинуклео- и антигликопротеиновых МКА.
4. Применение гликопротеина рабического вируса для определения специфических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методом ИФА.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 124 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы, практические предложения, список использованной литературы (всего 309 источников, в том числе 133 иностранных и 3 ссылки

на сайты internet) и приложения. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 5 рисунками.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2001 – 2006 гг. в лабораториях «Иммунологии» и «Культур клеток и гибридных технологий» ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (№ № гос. регистрации 01200202602 и 01200202603).

Отдельные фрагменты работы выполнены с участием с.н.с., к.в.н. В.Г. Гумерова, м.н.с., к.б.н. Л.И. Зайнуллина и соискателя Т.А.Савицкой.

2.1.1. Материалы исследований

В опытах применяли 2 штамма вируса бешенства (ВБ): вакцинный - "Овечий" ГНКИ (линия штамма Pasteur) и стандартный – CVS.

В работе использовали: 4 овцы массой 40-45 кг, 25 белых крыс массой 20-25 г., 1000 белых мышей беспородных массой 6-7 г, и 100 - линии BALB/c – массой 12-14 г.

В опытах *in vivo* применяли клеточную культуру NGUK-1 (Авцын А.В. и соавт., 1984), перевиваемые миеломные клетки SP 2/0 – Ag 4.1. Для поддержания роста культуры клеток NGUK-1использовали среды Игла-МЕМ и RPMI-1640, pH 7,2-7,4 с 3%-ным глутамином, 10 % фетальной сывороткой крови КРС. В культуральную среду добавляли пенициллин - 100 ЕД/мл и стрептомицин - 1 мг/мл.

В экспериментах использовали калибровочный набор белков для электрофореза (Pharmacia Biotech, США) и блокирующий раствор "NEW LAV BLOT I R2", 5X ("Sanofi diagnostics pasteur", Франция) и др.

Исследовано 12 проб патологического материала (головной мозг), из них 4 – от сельскохозяйственных, 3 – от домашних и 5 – от диких животных, поступившего в различные годы из неблагополучных по бешенству районов Республики Татарстан. В опытах исследовали также 77

образцов сывороток крови овец, иммунизированных антигеном возбудителя бешенства.

Контролем в опытах служили суспензии головного мозга интактных белых мышей (контрольный отрицательный антиген), а также иммуноглобулины (Ig) сывороток крови неиммунизированных животных. В качестве контрольного положительного антигена использовали мозг белых мышей, зараженных вирусом бешенства (ВБ), штамм «Овечий» ГНКИ, в качестве гетерологичного антигена – мозг мышей, зараженных вирусом болезни Ауески (ВБА), штамм ВГНКИ.

Образцы готовили в виде 10%-ной суспензии мозга на 0,85%-ном растворе NaCl с добавлением пенициллина и стрептомицина. Антигены предварительно осветляли центрифугированием при 800 g в течение 15 мин, инактивировали при 56 °С в течение 30 мин.

В работе использовали диагностические наборы, разработанные во ВНИВИ (г. Казань): «Флуоресцирующий антирабический глобулин» (ТУ 9388-012-00492374-99) и «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)» (ТУ 9388-083-00008064-98).

В экспериментах применяли диагностические антитела против иммуноглобулинов барана и белой мыши, меченные пероксидазой и флуоресцинизиотиоционатом, производства НИИЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва).

2.1.2. Методы исследований

1. Получение и очистка антигена. Использовали метод накопления вирусного материала путем интрацеребрального введения 10%-ной вирусодержащей суспензии белым беспородным мышам массой 4-6 г – 1000 голов и белым крысам массой до 40 г – 10 голов. Для получения культурального вируса бешенства, штамм "Овечий" ГНКИ, проводили заражение культуры клеток NGUK-1 путем внесения 10%-ной вирусодержащей суспензии мозга белых мышей в суспензию клеточной

культуры в концентрации 5×10^5 кл/мл в соотношении 1:1.

Освобождение вирусного материала от клеточного дебриса проводили по методу Н.А. Хисматуллиной, Р.Х. Юсупова (1998), с последующей очисткой в линейном градиенте плотности сахарозы (15-50%) – по В.Dietzschold (1996). В сравнительном аспекте проводили очистку и концентрирование вируса бешенства ацетатом цинка по F. Sokol (1975), а также 2,5 %-ным полиэтиленгликолем М 6000 по С.В. Кузнецовой и соавт. (1974).

2. Методы вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга. Степень очистки рабического вируса и его белковых фракций изучали методом диск-электрофореза в 12,5%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия по U.Laemmli (1970) и В.Dietzschold (1996). Контролем служил набор белков стандартной молекулярной массы (94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4 кД). Специфичность белковых фракций определяли иммуноблоттингом по Н.Towbin et al. (1979).

3. Метод флуоресцирующих антител (МФА). В работе применяли прямой МФА и непрямой - НМФА на предметных стеклах по М.А. Селимову и соавт. (1964) с использованием флуоресцирующего антирабического глобулина, разработанного в ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань.

4. Реакцию нейтрализации (РН) проводили по Х.Н. Джонсону (1975) на белых беспородных мышях массой 4-6 г.

5. Реакцию длительного связывания комплемента (РДСК) с целью титрования специфических антител ставили в пробирках по схеме E. Kuwert (1975). Сыворотки прогревали перед опытом в течение 30 мин. при $+56^{\circ}\text{C}$. Фаза связывания комплемента составляла 18 ч при $+4^{\circ}\text{C}$, фаза гемолиза – 20-30 мин. при $+37^{\circ}\text{C}$ до полного гемолиза в контроле.

6. Биологическую пробу ставили на белых беспородных мышях согласно ГОСТу 26075 – 84.

7. Иммуноферментный анализ проводили на 96-луночных пластиковых

микротитрационных планшетах (ВНИИ медицинской техники, Москва). Для определения антигенов ВБ применяли сэндвич-вариант ИФА. Для обнаружения антител в сыворотках крови иммунизированных животных, а так же моноклональных антител к структурным белкам ВБ, штамм «Овечий» ГНКИ, применяли непрямой вариант ИФА. Результаты оценивали на сканирующем спектрофотометре "Titertek multiskan" ("Flow laboratories", Финляндия) при длине волны 492 нм.

8. Иммунизацию мышей линии BALB/c проводили четырехкратно с интервалами в 30-, 5- и 20 суток антигеном ВБ, штамм «Овечий» ГНКИ, в смеси с полным и неполным адьювантами Фрейнда (ПАФ и НАФ) в сочетании с внутрибрюшинным и подкожным введениями (Lafon M., 1985).

9. Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигену возбудителя бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, использовали перевиваемые миеломные клетки SP2/0 – Ag 4.1 и спленциты белых мышей линии BALB/c в возрасте 4-6 недель, иммунизированных очищенными и концентрированными в градиенте плотности сахарозы антигенами ВБ (глико- и нуклепротеиновыми компонентами).

Выделение лимфоцитов и гибридизацию проводили по В.О.Херценбергу (1980) в соотношении 5:1.

Тестирование гибридных клонов осуществляли непрямым методом ИФА с применением гомологичных антигенов ВБ. В качестве конъюгата использовали диагностические антитела против Ig G мыши, меченные пероксидазой (НИИЭ и М им. Н.Ф. Гамалеи).

10. Криоконсервацию гибридных клеток проводили по А.А. Цуцаевой и Т.Ф. Петренко (1988). При этом использовали 24-36-ти часовые культуры гибридом, синтезирующие МКА и находящиеся в логарифмической фазе роста и образовавшие сплошной монослой.

11. Цифровой материал обрабатывали методами вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel 2000.

2.2. Разработка диагностических препаратов для выявления и идентификации вируса бешенства на основе моноклональных антител (МКА)

Получение МКА к антигену возбудителя бешенства проводили по следующей схеме: 1) подготовку и слияние иммунных спленоцитов и миеломных клеток; 2) тестирование гибридом с целью отбора клонов, продуцирующих антитела; 3) получение культур гибридомных клеток для накопления МКА; 4) использование МКА по целевому назначению.

2.2.1. Получение, очистка и концентрирование антигена вируса бешенства

Для получения концентрированного вируса бешенства использовали культуральный вирус, титр инфекционности которого составлял не менее 10^5 LD₅₀/мл. При этом чрезвычайно важным остается подбор оптимальных методов очистки и концентрирования, не вызывающих повреждение вирусной частицы с целью максимального сохранения протективнозначимых антигенных детерминант, расположенных на гликопротеине ВВ. Исходя из современных данных, для этих целей наиболее приемлемыми, на наш взгляд, являются три метода очистки и концентрирования: ацетатом цинка по F. Sokol (1975); 2,5 %-ным ПЭГ-6000 по С.В. Кузнецовой (1974) и ультрацентрифугированием (УЦФ) по В. Dietzschold (1996) с нашими модификациями, эффективность которых сравнивали между собой.

Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 1.

1. Сравнительный анализ эффективности методов очистки и концентрирования вируса бешенства

Методы очистки и концентрирования ВВ	Титр инфекционности, LD ₅₀ /мл	Концентрация белка, мг/мл	Титр антигена в ИФА (K _{ср} ≥ 2,1), 1/п*
Исходный ВВ	10 ^{3,84}	6,0 ± 0,3	128
Ацетатом цинка	10 ^{4,91}	2,2 ± 0,21	640
ПЭГ-6000	10 ^{4,89}	2,1 ± 0,20	640
УЦФ	10 ^{3,5}	1,7 ± 0,15	2560

Из данных табл. 1 следует преимущество метода УЦФ по В.Dietzschold (1996) с нашими модификациями, применение которого повышало инфекционный титр в 45,7 раза, антигенную активность – в 20 раз, а содержание белка снижало в 3,5 раза. В последующих экспериментах для очистки и концентрирования вируса бешенства использовали метод УЦФ. Модификация метода заключалась в оптимизации режима УЦФ: 50 000 г в течение 2-х ч. вместо 100 000 г в течение 1 ч по В.Dietzschold (1996).

Параллельно проводили электрофоретическое разделение ДСН-экстракта вирусосодержащей культуральной жидкости, контролями служили: осадок клеток NGUK-1, питательная среда и контрольный положительный антиген из набора для ИФА (производство ФГУ «ФЦТРБ»). Специфичность полученных белковых фракций контролировали методом иммуноблоттинга. Результаты представлены на рисунке.

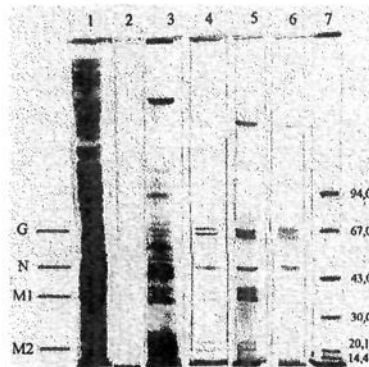


Рис. Электрофоретическое разделение и иммуноблоттинг ДСН-экстрактов концентрированного культурального вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ.

Обозначения: 2, 4, 6 - иммуноблотты полипептидов треков 1, 3, 5 соответственно; 1 - интактная культура клеток NGUK-1; 3 - культуральная среда, содержащая ВВ, штамм «Овечий» ГНКИ; 5 - очищенный и концентрированный культуральный ВВ штамм «Овечий» ГНКИ; 7 - маркерные белки (14,4; 20,1; 30,0; 43,0; 67,0; 94,0 кД); G, N, M₁, M₂ - обозначение основных структурных белков ВВ.

Из рисунка видно электрофоретическое разделение ДСН-экстракта очищенного и концентрированного вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, в 12,5 %-ном ПААГ (трек 4) на четыре группы мажорных белков (G – глико-, N- нуклео-, M1-фосфо- и M2-матричный протеины), что убедительно свидетельствует о высокой степени его чистоты. При этом трек №2 оказался чистым, что свидетельствует об отсутствии специфических белков ВВ в интактной культуре NGUK-1.

2.2.2. Изыскание оптимальной схемы гипериммунизации белых мышей линии BALB/c антигеном возбудителя бешенства

Важным условием для получения антителопродуцирующих гибридом является изыскание оптимальных схем иммунизации доноров спленоцитов – линейных мышей, эффективность которых определяется, в частности, активностью и специфичностью иммунизирующего антигена.

При изыскании оптимальной схемы иммунизации доноров спленоцитов - линейных мышей линии BALB/c, в качестве антигена использовали очищенный и концентрированный ВВ, штамм «Овечий» ГНКИ из расчета на одну инъекцию 10 мкг на мышь. Иммунизацию мышей проводили по 3-м схемам, отличия которых заключались в интервалах и способах введения антигена и сочетанием с полным и неполным адъювантами Фрейнда.

Сравнительный анализ схем иммунизации мышей линии BALB/c показал, что срок проведения иммунизации по 1-ой схеме наиболее длителен и составляет 46, по второй – 32 и по третьей – 31 суток, т.е. третья схема оказалась самой короткой. При этом активность сывороток крови была максимальной и соответствовала по НМФА 1:3200 и по ИФА 1:6400.

Таким образом, установлено преимущество иммунизации мышей по 3-ей схеме, которую и использовали в дальнейшей работе для иммунизации мышей линии BALB/c глико- и нуклеопротеиновыми компонентами вируса бешенства.

2.2.3. Получение гибридом, продуцирующих МКА к структурным белкам возбудителя бешенства и изучение их свойств

При получении гибридом скрининг положительных клонов проводили методом непрямого иммуноферментного анализа. В качестве твердой фазы использовали полистироловые планшеты. Положительным считали результат, более чем в 2,1 раза превышающий оптическую плотность в лунках с отрицательным контролем ($K_{cp} \geq 2,1$).

В результате слияния В-лимфоцитов с клетками миеломы SP 2/0-Ag 4.1 получено 27,9% и 29,2% гибридом, положительно реагирующих соответственно на гликопротеиновый и нуклеопротеиновый антигены вируса бешенства.

После отбора положительных клонов гибридных клеток, было проведено клонирование и реклонирование для выделения одиночных, стабильно продуцирующих клонов. Анализ позитивных клонов повторяли трижды для большей достоверности результатов.

Параллельно отбирали позитивные клоны для криоконсервации, установления специфичности и тестирования с эпизоотическими изолятами ВБ.

Для отбора положительных клонов сенсбилизацию планшетов проводили гомологичными белковыми антигенами: глико- и нуклеопротеинами рабического вируса, штамм «Овечий» ГНКИ. Всего в результате клонирования и реклонирования отобрано 13 стабильных клонов, продуцирующих моноклональные антитела к гликопротеину – 6 (25% от количества положительных клонов первичного скрининга) и нуклеопротеину – 7 (26%). При этом активность МКА к гомологичным структурным белкам ВБ варьировала от 1:640 до 1:1280.

Часть культуры гибридных клеток, синтезирующих МКА, замораживали в жидком азоте или в рефрижераторе при -70°C . Замораживали 24 – 36 часовые культуры, находящиеся в логарифмической

фазе роста и выросшие до сплошного монослоя.

Для изучения стабильности гибридом при хранении их в жидком азоте, через определенные сроки клетки размораживали и исследовали в непрямом ИФА. Результаты исследований показали, что гибридомы стабильно сохраняют свою активность при хранении в жидком азоте в течение 12 мес, в тоже время репродуцирующая активность гибридом, хранившихся в жидком азоте в течении 18 мес., снижалась и требовалось проведение большего количества пассажей после размораживания. Установлена также стабильность гибридом при хранений их в замороженном виде при -70°C в течение 6 мес. с некоторым снижением активности к 12-ому месяцу хранения.

2.2.4. Идентификация полевых штаммов возбудителя бешенства с помощью МКА к глико- и нуклеопротеинам рабического вируса методами иммунофлуоресценции и иммуноферментного анализа

Результаты испытания МКА к структурным белкам возбудителя бешенства 12 проб патматериала от различных животных, доставленных для исследования на бешенство из различных районов Республики Татарстан представлены в таблице 2.

2. Анализ эпизоотических изолятов ВБ по МФА с использованием МКА к глико- и нуклеопротеинам рабического вируса

Изоляты	Источник выделения (мозг)	Анализ отпечатков мозга по НМФА с помощью			Биопроба на белых мышах, инкубационный период, сут.
		МКА к		Поликло- нальной сыворотки	
		глико- протеину	нуклео- протеину		
1	2	3	4	5	6
Эксп. 3366	КРС	+	++++	+++	13...22
Эксп. 5312		+	++++	+++	15...22
Эксп. 4688		+	+++	++	14...20
Эксп. 3518	МРС	+	++++	+++	10...22

продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6
Эксп. 2042	лиса	отр.	++++	+++	15...20
Эксп. 3121	лиса	отр.	++++	+++	14...20
Эксп. 4848		отр.	++++	+++	12...20
Эксп. Л2		отр.	отр.	отр.	отр.
Эксп. 5262		отр.	++++	+++	15...23
Эксп. 5276		+	++++	+++	10...22
Эксп. 4765	собака	отр.	+++	+++	15...21
Эксп. 2625	кошка	отр.	++++	+++	12...19
Эксп. 3500		отр.	++++	+++	16...21
Контроль ВВ, «Овечий» ГНКИ	мышь	+	++++	++++	5...6
Контроль ВВА, шт. ВГНКИ		отр.	отр.	отр.	3...5

Из данных табл. 2 следует более четкое выявление антигена эпизоотических штаммов вируса бешенства в мазках-отпечатках с использованием МКА к нуклеопротеину рабического вируса, оцениваемое на 3 креста (экспертиза № 4688, 4765), а также на 4 креста (эксп. №№ 3366, 5312, 3518, 2042, 3121, 4848, 5262, 2625, 3500, 5276), тогда как с помощью поликлональной антирабической сыворотки положительная реакция оценивалась на 2–3 креста. В то же время с помощью МКА к гликопротеину возбудителя бешенства специфический АГ выявлялся лишь на 1 крест или вообще не выявлялся. При этом как положительные, так и отрицательные результаты анализа с помощью МКА полностью совпали с результатами классической биопробы на белых мышах. Однако время анализа проб по МФА занимало 5–6 часов, при этом для проведения биопробы требовалось до 26 суток наблюдения за подопытными животными.

В культуре клеток NGUK-1, зараженной эпизоотическими изолятами, выделенными из мозга КРС (эксп. 3366) и лисицы (эксп. 5262) антиген вируса бешенства с помощью МКА к белку N выявляли в НМФА в виде ярких желтовато-зеленых гранул различной формы и величины - от едва заметных до имеющих 15-20 мкм диаметре. В контроле, где клетки NGUK-1 инкубировали с мозговой взвесью от интактных животных, и обработанные МКА к нуклеопротеину рабического вируса с дальнейшим окрашиванием флуоресцирующими антителами к Ig G белой мыши, специфических гранул не отмечено.

Таким образом, установлена антигенная гомология изученных эпизоотических изолятов ВБ к нуклеопротеину вакцинного вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, и возможность применения МКА к нуклеопротеину рабического вируса для диагностики и идентификации возбудителя бешенства в патологическом материале непрямым МФА.

С помощью МКА к гликопротеину возбудителя бешенства специфический нуклеокапсидный АГ выявлялся слабо (лишь на 1 крест) или вообще не выявлялся, что свидетельствует об их специфичности. При этом они в реакции иммунофлуоресценции с использованием флуоресцирующего антивидового конъюгата окрашивают цитоплазматическую мембрану инфицированных клеток NGUK-1, нейтрализуют *in vivo* гомологичный штамм «Овечий» ГНКИ и эпизоотические изоляты с титром инфекционности 1,1-3,8 LD₅₀. Результаты РН, с использованием белых мышей, различных эпизоотических изолятов возбудителя бешенства моноклональными антителами к гликопротеину вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, представлены в таблице 3.

3. Результаты РН на мышах различных эпизоотических изолятов возбудителя бешенства с помощью МКА к гликопротеину вируса бешенства, штамм «Овечий ГНКИ»

Изоляты	Источник выделения (мозг)	Титр вируса, lg LD ₅₀ /0,03 мл	МКА к гликопротеину, индекс нейтрализации
Эксп.3366	КРС	1,73	0,75
Эксп.5312		1,83	0,82
Эксп.5264		1,24	0,74
Эксп.3518	МРС	1,10	0,41
Эксп.2042	лиса	1,65	0,85
Эксп. 3121		1,23	0,45
Эксп. 4848		1,70	0,90
Эксп. 5262		1,14	0,34
Эксп. 5276		1,54	0,84
Эксп.4765	собака	1,13	0,23
Эксп. 2625	кошка	1,17	0,27
Эксп.3500		1,83	0,73
ВБ, «Овечий» ГНКИ	мышь	3,80	2,70

Серией экспериментов исследована возможность применения моноклональных антител к структурным белкам (G и N) вируса бешенства в сэндвич-варианте ИФА для сенсibilизации планшета, контролем служил поликлональный антирабический глобулин. При этом для сенсibilизации планшета использовали МКА к гликопротеину (В 1; С 4) и нуклеопротеину (Е 2; F 3) отдельно и в смеси с активностью в ИФА 1:1280 (Ксп > 2,1) и концентрацией по белку 5 мкг/мл. В качестве специфического иммуноферментного конъюгата использовали антирабический глобулин, меченный пероксидазой, взятого из «Набора...», разработанного в ФГУ «ФЦТРБ – ВНИВИ» (г. Казань). Результаты представлены в таблице 4.

4. Анализ эпизоотических изолятов рабического вируса в ИФА с использованием МКА к основным структурным белкам вируса бешенства

Изоляты	Источник выделения (мозг)	Титры антигена ВБ в ИФА, 1/п*, с помощью			
		МКА к гликопротеину	МКА к нуклеопротеину	МКА к глико- и нуклеопротеинам 1:1	Поликлонального антирабического глобулина
1	2	3	4	5	6
Эксп. 3366	КРС	20	20	40	40

продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6
Эксп. 5312		40	40	80	80
Эксп. 4688		10	10	20	20
Эксп. 3518	МРС	40	40	80	80
Эксп. 2042	лиса	10	10	20	20
Эксп. 3121		20	20	40	40
Эксп. 4848		40	40	80	80
Эксп. 5262		10	10	20	20
Эксп. 5276		20	20	40	40
Эксп. 4765	собака	10	10	20	20
Эксп. 2625	кошка	10	10	20	20
Эксп. 3500		40	40	80	80
Контроль ВБ «Овечий» ГНКИ	мышь	160	160	320	320
Контроль ВБА, шт. ВГНКИ		отр.	отр.	отр.	отр.

Примечание: * - обратные значения титров антител к вирусу бешенства

Из данных табл. 4 следует, что наиболее приемлемым для сенсibilизации планшета является использование смеси МКА к глико- и нуклеопротеинам возбудителя бешенства. При этом титры специфического антигена ВБ в патологическом материале определяются тождественно при использовании поликлонального глобулина в пределах 1:20 – 1:320. МКА только к гликопротеину или нуклеопротеину позволяют обнаруживать АГ в более низких титры в пределах 1:10 – 1:160. Поэтому в последующих исследованиях для сенсibilизации планшета использовали смесь МКА. Данные результаты объясняются тем, что смесь МКА к глико- и нуклеопротеинам выявляет больший спектр антигенов в вируссодержащей суспензии, чем МКА к глико- и нуклеопротеинам в отдельности.

В дальнейшем нами была установлена возможность применения МКА к глико- и нуклеопротеинам рабического вируса для контроля антигенности антирабических вакцин. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии перекрестной реакции между МКА к белку-G и

нуклеопротеином и МКА к белку-N и гликопротеином. При этом титры антигенов вакцинных штаммов «Щелково – 51» и «РБ – 71» в ИФА с использованием МКА: к белку-G и к белку-N составил 1:256. В тоже время использование смеси МКА выявило антигенную активность вакцинных препаратов в титрах 1:512, т.е. двукратно превышающих таковые при использовании МКА к глико- и нуклеопротеинам в отдельности. Это связано с тем, что исследуемые вакцинные препараты являются цельновирионными.

Учитывая, что вируснейтрализующие антитела вырабатываются в ответ на гликопротеиновый компонент антирабической вакцины, МКА к гликопротеину вируса бешенства рекомендуем использовать для контроля антигенности вакцинных препаратов на всех стадиях технологического процесса при производстве антирабических вакцин.

2.2.5. Применение гликопротеина вируса бешенства для выявления антирабических антител методом ИФА

Целью дальнейших исследований явилось изучение возможности применения гликопротеина вируса бешенства для выявления антирабических антител в сыворотках крови иммунизированных животных, методом ИФА, а также проведение сравнительной оценки эффективности метода ИФА с РН и РДСК в лабораторных условиях.

Непрямым методом ИФА, а также в РН на мышах исследовано 10 проб сывороток крови овец, иммунизированных антигеном ВБ, штамм «Овечий» ГНКИ. В РН применяли стандартный вирус бешенства, штамм CVS, в концентрации 500 LD₅₀/0,03 мл.

Для сенсibilизации планшета использовали специфический антиген на основе гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, активность которого в ИФА составила 1:1280 ($K_{сн}=2,1$), в концентрации по белку – 5 мкг/мл. В качестве антивидовых конъюгатов использовали диагностические антитела против иммуноглобулинов барана и кроликов,

меченных пероксидазой, производства НИИЭ и М им. Н.Ф. Гамален, в рабочем разведении 1: 4000.

Сопоставление полученных данных свидетельствует о прямой корреляции результатов титрования сывороток крови методом ИФА и РН на мышцах ($r = 3$; $P < 0,05$). По чувствительности метод ИФА превосходит реакцию нейтрализации.

Непрямым методом ИФА и параллельно в РДСК было исследовано 77 проб сывороток крови овец, иммунизированных антигеном вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ.

В острых опытах установлено, что защитным титром специфических антител является разведение 1:800 и более.

Полученные результаты показывают, что, непрямым вариантом ИФА с использованием гликопротеина ВБ, штамм «Овечий» ГНКИ высокочувствителен и специфичен. Чувствительность его превосходит РДСК более чем в 100 раз. Таким образом, установлена возможность применения гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ для титрования антирабических сывороток методом ИФА.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствованы методы идентификации вируса бешенства с применением моноклональных антител (МКА) к глико- и нуклеопротеинам рабического вируса, определяющих его групповую принадлежность. Получены 13 клонов гибридом, стабильно продуцирующие специфические антитела, в том числе: 6 клонов – к гликопротеину и 7 клонов – к нуклеопротеину возбудителя бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ.

2. Установлено преимущество метода ультрацентрифугирования для очистки и концентрирования вируса бешенства по сравнению с осаждением ацетатом цинка и ПЭГ 6000. При этом титр инфекционности вируса повышается в 45,7 раза, а антигенная активность – в 20 раз.

3. Получены очищенные глико- и нуклеопротеиновые компоненты вируса бешенства путем фракционирования в градиенте плотности сахарозы (15-

50%), высокая степень чистоты которых подтверждена электрофорезом в ПААГ, а специфичность – методами иммуноблоттинга, ИФА, НМФА и РН.

4. Изыскана оптимальная схема гипериммунизации белых мышей линии BALB/c, обеспечивающая максимальный выход спленоцитов, вырабатывающих антитела к антигенам вируса бешенства. Схема предусматривает пятикратное введение смеси антигена с полным адъювантом Фрейнда с интервалом в 7 суток и сочетанием внутривенных инъекций с подкожными.

5. Моноклональные антитела к гликопротеину вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, в реакции иммунофлуоресценции с использованием флуоресцирующего антивидового конъюгата окрашивают цитоплазматическую мембрану инфицированных клеток NGUK-1, нейтрализуют *in vivo* гомологичный штамм «Овечий» ГНКИ и эпизоотические изоляты с титром инфекционности 1,1-3,8 LD₅₀ и могут быть использованы для контроля антигенной активности антирабических вакцин.

6. Моноклональные антитела к нуклеопротеину возбудителя бешенства выявляют нуклеокапсидный антиген эпизоотических изолятов вируса бешенства в патматериале и культуре клеток NGUK-1, но не вступают в реакцию нейтрализации. Установлена большая специфичность МКА к нуклеопротеину вакцинного штамма рабического вируса, по сравнению с поликлональной сывороткой, проявляющаяся более выраженной флуоресценцией нуклеокапсидов эпизоотических изолятов, что свидетельствует об антигенной гомологии эпизоотических изолятов и нуклеопротеина вакцинного штамма рабического вируса.

7. Установлена стабильность гибридом, продуцирующих МКА к антигенам вируса бешенства при хранении в жидком азоте (-196⁰С) в течение 12 месяцев.

8. Использование гликопротеина рабического вируса, штамм «Овечий» ГНКИ, обеспечивает выявление антирабических антител в сыворотках крови животных методом иммуноферментного анализа. Сравнительное

исследование проб сывороток крови животных в непрямом ИФА, РДСК и РН на мышах показало прямую корреляцию результатов серологических тестов и высокую чувствительность и экспрессность ИФА по сравнению с РДСК и РН.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Результаты исследований вошли в следующие разработанные и внедренные в практику НТД:

1. “Наставление по применению набора препаратов для выявления антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА)”, утвержденное директором ВНИВИ 21.11.2003 г.;

2. “Инструкцию по применению моноклональных антител к нуклеопротеину рабического вируса для идентификации возбудителя бешенства методом иммунофлуоресценции, утвержденная директором ФГУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”, г. Казань от 15.05. 2006 г.;

3. “Инструкцию по применению набора препаратов на основе моноклональных антител к антигенам рабического вируса для идентификации возбудителя бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА), утвержденная директором ФГУ “ФЦТРБ-ВНИВИ”, г. Казань от 9.06. 2006 г.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тимиргалеев, Р.В. Изыскание оптимальной схемы гипериммунизации белых мышей линии BALB/c антигеном вируса бешенства / Н.А. Хисматуллина, Р.В. Тимиргалеев, В.Г. Гумеров, Р.Х. Юсупов, Р.Я. Гильмутдинов // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». – Ульяновск, 2003. – Т.1. – С. 121-122.

2. Тимиргалеев, Р.В. Получение и применение моноклональных антител для идентификации возбудителя бешенства / Н.А. Хисматуллина,

Р.В. Тимиргалеев, В.Г. Гумеров, Л.И. Матвеева, Р.Я. Гильмутдинов, Р.Х. Юсупов // - Там же -Т.1.- С. 142 – 143.

3. Тимиргалеев, Р.В. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к гликопротеину и нуклеопротеину возбудителя бешенства / Р.В. Тимиргалеев, Н.А. Хисматуллина, Р.Я. Гильмутдинов, Р.Х. Юсупов, В.Г. Гумеров // *Материалы международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных заболеваний.* – Казань, 2005. – Ч.2. – С. 333-338.

4. Тимиргалеев, Р.В. Иммуноферментный анализ патматериала с помощью моноклональных антител к глико- и нуклеопротеину вируса бешенства / Р.В. Тимиргалеев, Н.А. Хисматуллина // *Матер. Всероссийской научно-практической конференции “Перспективы агропромышленного производства регионов России в условиях реализации приоритетного национального проекта “Развитие АПК”, 28 февраля-3 марта 2006 г.:* Уфа, 2006. – С. 97.

5. Тимиргалеев, Р.В. Получение и применение концентрированного вируса бешенства и его структурных белковых фрагментов / Р.В.Тимиргалеев, Н.А.Хисматуллина, В.Г.Гумеров // - Там же-. – С. 97-98.

6. Тимиргалеев, Р.В. К вопросу диагностики бешенства с помощью моноклональных антител методом флуоресцирующих антител / Р.В.Тимиргалеев, Н.А.Хисматуллина // - Там же-. – С. 99.

7. Тимиргалеев, Р.В. Способ получения очищенного и концентрированного вируса бешенства и его структурных компонентов / Р.В.Тимиргалеев // «Учёные записки» Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – 2006. – Т.183 – С. 210 – 216.

Заказ №2. Подписано в печать 07.12.06. Формат 60x84 1/16. Усл. п. л. 1. Тираж 100 экз.
Офсетный участок ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань).
Адрес: 420075, г. Казань, Научный городок-2.