

Н.А.Шарапова, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, М.Н.Киреев, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева,
Т.А.Михеева, М.В.Галкина, Я.М.Краснов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА *IN VITRO* В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Впервые сконструирован диагностикум на основе наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм для обнаружения специфических антител к вирусу бешенства в антирабических сыворотках и препарате антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе [15]. Проведены исследования по выявлению корреляции между результатами реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах и дот-иммуноанализа. Результаты последнего коррелируют с таковыми в реакции нейтрализации и, следовательно, предложенный метод можно рассматривать как альтернативный методу *in vivo* – реакции нейтрализации на белых мышах. Применение метода *in vitro* актуально при исследовании активности антирабических сывороток на этапе иммунизации лошадей.

Ключевые слова: бешенство, наночастицы, коллоидное золото, диагностикум.

Бешенство, в связи с абсолютной летальностью и необходимостью проведения курса лечебно-профилактических прививок по жизненным показаниям, является серьезной проблемой практического здравоохранения. Эпизоотическая и эпидемическая ситуация в большинстве регионов России по бешенству чрезвычайно сложна, и поэтому организации мер борьбы с опасной болезнью, общей для человека и животных, придается особое значение [3, 10, 14]. Ежегодно в Российской Федерации за антирабической помощью обращаются около 500 тыс. чел., примерно половина из них получает направление на специфическое антирабическое лечение [10]. Для экстренной профилактики заболевания людей гидрофобией при тяжелых укусах бешеными или подозрительными на бешенство животными применяют антирабический иммуноглобулин в сочетании с антирабической вакциной [12, 19].

При производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина уровень активности антирабических сывороток и готового препарата определяют *in vivo* в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах [8]. Однако данный метод трудоемок, требует большого количества животных, длительного времени наблюдения (14 дней) и предполагает использование инфекционного агента. В связи с этим актуальной представляется разработка альтернативных методов определения специфической активности антирабических гипериммунных сывороток и иммуноглобулина, что неоднократно подчеркивал в своих документах комитет экспертов ВОЗ [24, 25].

В производстве антирабических препаратов для обнаружения специфических антител в иммунных сыворотках *in vitro* применяют следующие методы: реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) [21], недостатками которой являются использование для конструирования диагностикума нестабильных биологических компонентов и трудоемкость постановки; тест ингибции фокусов флуоресценции

(ТИФФ) [13], который является трудоемким, дорогостоящим, требующим наличия квалифицированных специалистов и специального оборудования для работы с перевиваемой культурой клеток, использования токсичных реагентов для фиксации клеток; реакция диффузионной преципитации (РДП) [19], реакция связывания комплемента (РСК) [20], недостатками которых является их низкая чувствительность; иммуноферментный анализ (ИФА) [5, 17], при постановке которого применяют токсичные, канцерогенные хромогены, а учет результатов предусматривает использование спектрофотометрического анализатора. Последний из вышеперечисленных методов наиболее распространен в биотехнологической практике.

Указанные недостатки методов обусловили необходимость разработки безынструментальных тест-систем с использованием неферментных диагностикумов для определения уровня специфических антител [16]. На наш взгляд, оптимальным решением данной задачи является применение дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота (КЗ). До настоящего времени дот-иммуноанализ не находил широкого применения в производстве антирабического иммуноглобулина в связи с отсутствием соответствующих коммерческих диагностикумов для исследования активности иммунных сывороток.

В последние годы возрастает количество публикаций, посвященных применению наночастиц КЗ и его конъюгатов в твердофазном иммуноанализе для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний человека и животных [4, 9, 23]. На сегодняшний день наночастицы КЗ, используемые в качестве метки, являются важным компонентом современных иммунохимических тест-систем [5, 7]. Процедура получения КЗ и его комплексов с антигенами экспрессна, предусматривает использование одноэтапной методики приготовления. Использование в качестве маркера КЗ исключает целый ряд дополнительных процедур,

свойственных ИФА, кроме того, чувствительность тест-систем с использованием золотосодержащих маркеров превосходит чувствительность методов с использованием ферментных меток [4].

Целью настоящего исследования явилось конструирование диагностикума на основе наночастиц КЗ для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе и изучение возможности применения диагностикума при производстве антирабического иммуноглобулина.

Материалы и методы

Использовали инактивированную кроличью вируссодержащую 10 % мозговую суспензию и осажденный из суспензии путем сахарозо-ацетоновой экстракции фиксированный вирус бешенства штамма «Москва-3253» [2]. Работы по получению и инаktivации вируссодержащей мозговой суспензии проводили в соответствии с МУ 3.3.1.1099-02 [11] и СП 1.3.2322-08 [18].

Раствор КЗ с диаметром частиц 15–17 нм получали по методу Г.Френса из золотохлористоводородной кислоты [22]. Для максимального удаления балластных частиц ткани мозга инактивированный вируссодержащий материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,22 мкм. «Золотое число» определяли по методу Р.Жигмонди [6]. Для оптимальных условий стабилизации увеличивали pH коллоидного раствора золота 0,2 М раствором углекислого калия (0,2 М K_2CO_3) до pH 7,0. Далее в раствор коллоидного золота с оптимальным значением pH 7,0 добавляли необходимое количество антигена в соотношении по объему маркера к антигену от 10:1 до 320:1 в соответствии с выявленным «золотым числом». С целью блокировки свободных сайтов поверхности наночастиц золота и вторичной стабилизации конъюгата к нему добавляли 0,5 % раствор высокомолекулярного полимера ПЭГ-20М до конечной концентрации 0,02 %. Затем полученный диагностикум выдерживали при температуре 3–5 °С не менее 1 ч, по истечении которого конъюгат брали в работу.

В качестве твердой фазы при постановке прямого варианта дот-иммуноанализа применяли расчерченную на квадраты нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм. В микротитровальных планшетах готовили последовательные двукратные разведения исследуемых образцов на деионизованной воде 1/20, 1/40, 1/80 и т. д. по 20 мкл. Исследуемый образец сыворотки или иммуноглобулина наносили на нитроцеллюлозную мембрану аликвотами по 2 мкл. Полоску мембраны с нанесенными образцами выдерживали до полного высыхания. Для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 0,5 % раствор ПЭГ-20М или 1–3 % раствор БСА, приготовленные на деионизованной воде, и инкубировали в течение 15 мин при температуре

20–22 °С. После инкубации мембрану промывали деионизованной водой и помещали в пакет-камеру из пленки типа «Parafilm», куда добавляли 400 мкл диагностикума. Мембрану выдерживали до появления красных пятен. Для повышения чувствительности метода проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембрану погружали в раствор физического проявителя. Трехкомпонентный проявитель готовили непосредственно перед использованием, для чего к 600 мкл деионизованной воды добавляли 400 мкл 0,5 % раствора лимонной кислоты, 1000 мкл 0,2 % раствора метола и 40 мкл 0,2 % раствора нитрата серебра. После процедуры усиления мембрану отмывали в деионизованной воде и высушивали.

За титр сыворотки или иммуноглобулина принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно.

Результаты и обсуждение

При исследовании специфической активности препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) методом *in vitro* положительный результат регистрировали в разведении 1:5000 – 1:10000, у отдельных серий – до 1:20000. Для выявления корреляции результатов дот-иммуноанализа и РН проводили сравнительное изучение активности препарата АИГ серий № 34–46 (таблица).

Титры специфических антител, выявленные в реакции нейтрализации на мышах, колебались в пределах от 1:2576 до 1:13772, титры специфических антител, определенные методом дот-иммуноанализа, – от 1:2500 до 1:20000. Показана линейная корреляция между результатами РН и дот-иммуноанализа, коэффициент корреляции $r = 0,9$ [1].

Уровень активности гипериммунных антирабических лошадиных сывороток, выявленный методом дот-иммуноанализа, соответствовал значениям 1:320 – 1:640, у отдельных сывороток – до 1:1280.

На рисунке представлены результаты определения активности препарата гетерологичного иммуноглобулина различных серий (а) и антирабических гипериммунных сывороток (б) методом дот-иммуноанализа. КЗ, входящее в состав диагностикума, обеспечивает интенсивное розовое или красно-коричневое окрашивание пятен, соответствующих положительной реакции последовательных разведений исследуемых образцов с конъюгатом.

Несомненный научный и практический интерес представляло изучение возможности применения сконструированного на основе наночастиц КЗ диагностикума при определении активности сывороток людей, прошедших специфическое антирабическое лечение в связи с укусом подозрительных на бешенство животных. В работе была исследована сыворотка пациента С., прошедшего курс вакцинации концентрированной культуральной антирабической вакциной. Материал для изучения был взят через месяц после окончания вакцинации. При определении

Специфическая активность препарата антирабического иммуноглобулина и антирабических лошадиных гипериммунных сывороток в тестах *in vivo* (РН) и *in vitro* (дот-иммуноанализ)

Номер серий препарата АИГ	Титр специфических антител в РН	Количество LD ₅₀ /0,03 мл в РН	Активность в РН, МЕ/мл	Титр специфических антител в ДИА
34	1:8000	333	320	1:10000
35	1:8812	333	360	1:10000
36	1:12912	333	410	1:10000
37	1:7962	562,5	621	1:5000
38	1:5623	576,5	634	1:5000
39	1:2951	562,5	230	1:2500
40	1:7130	469	358	1:5000
41	1:8689	469	434	1:10000
42	1:2576	576,5	291	1:2500
43	1:12302	617,8	419	1:10000
44	1:10000	617,8	341	1:10000
45	1:13772	316	556	1:20000
46	1:10839	316	438	1:10000
Средняя геометрическая титров 1:8582				Средняя геометрическая титров 1:8462

уровня содержания вируснейтрализующих антител в крови вакцинированного выявлен титр 1:1280.

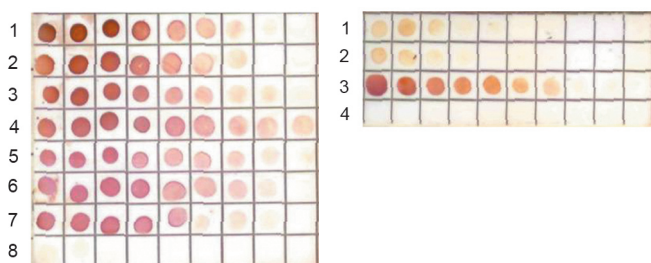
Таким образом, для определения активности антирабических гипериммунных сывороток и готового препарата иммуноглобулина предложен прямой вариант дот-иммуноанализа, рассматриваемый как альтернативный методу *in vivo* – реакции нейтрализации на белых мышах, особенно актуальный на этапе иммунизации лошадей-продуцентов, когда необходимо оценить активность иммунных сывороток в короткие сроки с целью определения тактики эксплуатации лошади. Результаты дот-иммуноанализа коррелируют с таковыми в реакции нейтрализации. Предлагаемый метод прост и экономичен как в отношении трудозатрат, так и времени, не требует применения инфекционного агента, лабораторных животных и специального оборудования для учета результатов. Применение неферментного конъюгата при постановке дот-иммуноанализа безопасно для

пользователя, поскольку коллоидное золото нетоксично и неаллергенно.

Работа выполнена по Государственному контракту № 115-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев П.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 180 с.
2. Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований. Клинико-эпидемиологические характеристики малоизученных арбовирусных инфекций. Подходы к мониторингу природных очагов арбовирусов (методические рекомендации). Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Вирусология. 1991; 25. 116 с.
3. Данилов А.Н., Фёдорова З.П., Кожанова О.И. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Саратовской области и некоторые проблемы профилактики рабической инфекции. Матер. IX съезда Всероссийского науч.-практ. об-ва эпизоотологов, микробиологов и паразитологов. М.: 2007. 165 с.
4. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 259 с.
5. Евстигнеев О.В., Ручко С.В., Борисевич С.В. и др. Разработка и экспериментальное изучение иммуноферментных тест-систем для выявления антигена вируса бешенства и антител к нему. В кн.: Актуальные проблемы защиты от возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний: Матер. науч.-практ. конф. Сергиев Посад; 2004. С. 128–9.
6. Жигмонди Р. Коллоидная химия. Харьков, Киев: Изд-во НК Снаба УССР; 1933. 452 с.
7. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И. и др. Выявление антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализом с использованием стафилококкового белка А, меченного частицами коллоидного золота. Пробл. особо опасных инф. 1999; 77: 77–81.
8. Каплан М., Копровски Х., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 94–97.
9. Краснов Я. М. Исследование агрегации наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с биополимерами [дис. ... канд. хим. наук]. Саратов; 2003. 126 с.
10. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология: Руководство. М.: ООО Медицинское информационное агентство; 2008. 656 с.
11. Методические указания «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» МУ 3.3.1.1099-02. М.; 2002. 28 с.
12. Мовсисянц А.А. Препараты для профилактики бешенства. В кн. Медицинские иммунобиологические препараты для



Результаты дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота:

- а – по оси абсцисс: двукратные разведения иммуноглобулина, начиная с 1:160; по оси ординат: 1–7 – антирабический иммуноглобулин серий 02, 09, 12, 13, 14, 19, 32; 8 – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль);
 б – по оси абсцисс: двукратные разведения сывороток и иммуноглобулина, начиная с 1:160; по оси ординат: 1, 2 – антирабические лошадиные сыворотки; 3 – антирабический иммуноглобулин серии 37; 4 – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль)

профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций. М.; 2004. С. 47–48.

13. Недосеков В.В., Вишняков И.Ф., Жестерев В.И. и др. Титрование антирабических антител с помощью теста ингибции фокусов флуоресценции. Ветеринария. 1998; 7: 28–30.

14. Онищенко Г.Г., Верещагин А.И. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены Роспотребнадзора; 2007. 360 с.

15. Подборонова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Иммунодиагностический тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа. Патент RU 2360252. 27.06.2009

16. Раев М.Б., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л. и др. Конструирование и применение универсальной тест-системы с использованием неферментных диагностических для безинструментальной оценки уровня специфических антител. Биотехнология. 2006; 1: 84–88.

17. Сазанова Э.Я., Кузнецова С.В., Маслов Е.В. и др. Иммуноферментный анализ при индикации вируса бешенства и определении уровня антител. Ветеринария. 1991; 8: 63–4.

18. Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08. М., 2008.

19. Селимов М.А., Ключева Е.В., Аксенова Т.А. и др. Лечение инактивированной культуральной антирабической вакциной и антирабическим гамма-глобулином людей, укушенных бешеными или подозрительными на бешенство животными. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1978; 12: 105–12.

20. Тюшнякова М.К., Неболюбова Г.Е. Реакция связывания комплемента как метод определения специфической активности антирабической сыворотки и гамма-глобулина. Тр. Томского НИИВС. Томск; 1960; XII: 261–5.

21. Шафеева Р.С., Шамсувалеева А.К. Использование РНГА для титрования сывороток доноров при получении антирабического иммуноглобулина из крови человека. В кн.: Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. Уфа; 1995. Ч. 1. С. 206–8.

22. Frens G. Controlled nucleation for the particle size in monodisperse gold suspension. Nature Phys. Sci.; 1973.

23. Petrov R.V., Shwartsburd B.I., Bogatyrev V.A. et al. Solid-phase immunoassay with colloidal gold conjugates for diagnosis of HIV-infection. In: 15th Intern. Congr. biochem. Jerusalem; 1991.

24. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 824. Geneva, Switzerland; 1994.

25. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 931, Geneva, Switzerland; 2005.

N.A.Sharapova, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, M.N.Kireev, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, T.A.Mikheeva, M.V.Galkina, Ya.M.Krasnov

Determination of the Activity of the Anti-Rabies Sera and Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin *in vitro* in the Dot Immunoassay

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

For the first time constructed was a diagnosticum based on colloid gold nanoparticles (with an average size of about 15–17 nm) to detect specific antibodies against rabies virus in the anti-rabies sera and immunoglobulin *in vitro* in the dot-immunoassay [24]. Investigated was the correlation between the results of the rabies virus neutralization test on white mice and the results of the dot immunoassay. The results of the dot immunoassay correlated with those of the neutralization test on white mice. Thus, the method offered can be considered as an alternative to the *in vivo* neutralization test. This *in vitro* method can be used to test the activity of the anti-rabies sera at the stage of horses immunization.

Key words: rabies, nanoparticles, colloid gold, diagnosticum.

Об авторах:

Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Galkina M.V., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 01.10.09.