

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, О.А.Лобовикова, Р.А.Свинцов,
А.В.Комиссаров, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров

КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ АНТИГЕН В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

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

Показана возможность применения культурального рабического антигена, полученного на основе фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253, для иммунизации лошадей – продуцентов антирабической сыворотки. Установлено, что к 11-й неделе иммунизации специфические антитела накапливаются в титре не ниже 1:500 (специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышах и в дот-иммуно-анализе), что является достаточным для фракционирования иммунной сыворотки и выделения антирабического иммуноглобулина. Физико-химические и биологические свойства антирабического иммуноглобулина, полученного по технологии с использованием культурального антигена, удовлетворяют требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади. Уровень специфической активности экспериментальных серий антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культуральных технологий, соответствует 242 и 214 МЕ/мл.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, вирус бешенства, культуральный антиген.

S.V.Generalov, E.G.Abramova, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, O.A.Lobovikova, R.A.Svintsov, A.V.Komissarov,
M.N.Kireev, A.K.Nikiforov

Cultural Antigen in the Technology for Anti-Rabies Immunoglobulin Obtainment from Equine Blood Serum

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Displayed is the possibility of application of cultural rabies antigen, derived from fixed rabies virus of the strain "Moscow 3253", for immunization of horses – producers of anti-rabies serum. Determined is the fact that specific antibody titers are higher than 1:500 toward the 11th week after immunization (specific activity is identified using neutralization reaction on the model of white mice and dot-blot immunoassay). This level of activity is sufficient for the fractioning of immune serum and extraction of anti-rabies immunoglobulin. Physicochemical and biological properties of the anti-rabies immunoglobulin, obtained with the help of cultural antigen technique, meet the requirements stated in the normative documentation on anti-rabies immunoglobulins extracted from equine blood serum. Specific activity level of experimental batches of anti-rabies immunoglobulin, obtained with the help of cultural technologies, corresponds to 242 and 214 IU/ml.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, rabies virus, cultural antigen.

Бешенство – особо опасное острое инфекционное заболевание человека, а также теплокровных диких и домашних животных природно-очагового характера. Согласно оценке ВОЗ, бешенство входит в группу инфекционных болезней, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб, и, вследствие абсолютной летальности, представляет серьезную проблему современного здравоохранения [14]. Для постэкспозиционной профилактики бешенства используют специфический иммуноглобулин совместно с антирабической вакциной.

Многие производители гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ), в том числе и РосНИПЧИ «Микроб», для иммунизации продуцентов используют антиген, полученный на основе фиксированного вируса бешенства, репродуцированного в мозговой ткани животных.

В настоящее время ВОЗ рекомендует отказаться от использования органотканевого антигена ввиду

высокой вероятности развития поствакцинальных осложнений, связанных с возможным образованием антител-нейротоксинов в ответ на введение примесей мозговой ткани [5, 14]. В качестве альтернативного варианта предложено использовать вирус бешенства, репродуцированный на клеточных культурах.

Ранее отечественными и зарубежными исследователями показана возможность использования различных штаммов фиксированного вируса бешенства, репродуцированных на клеточных культурах, для получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина [6, 9, 11, 13].

Целью настоящего исследования явилась разработка способа получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей с использованием антигена, полученного на основе штамма фиксированного вируса бешенства Москва 3253, репродуцированного на перевиваемой клеточной линии Vero. Возможность применения данного анти-

гена была рассмотрена ранее, о чем свидетельствует положительный опыт получения АИГ из сыворотки крови кроликов [2].

Используемый штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 на протяжении многих лет применяют для производства антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Выбор субстрата для репродукции вируса – клеточной линии Vero – обусловлен ее безопасностью, отсутствием онкогенных свойств, а также преимуществами перевиваемых клеточных линий: высокой потенцией роста клеток, стандартностью биологических свойств, возможностью крупномасштабного культивирования в ферментерах большого объема [4].

Материалы и методы

Фиксированный вирус бешенства (штамм Москва 3253) выращивали на перевиваемой клеточной линии Vero суспензионным и псевдосуспензионными методами с использованием биореактора BioG-M Plus («BioTron», Корея) вместимостью 5 л. Для культивирования клеток и вируса псевдосуспензионным методом использовали микроносители Cytodex 3 (Sigma). Для культивирования клеток Vero использовали среду Игла MEM с 10 % содержанием сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия); вируса бешенства – среду 199 («Биолот», Россия) с содержанием человеческого сывороточного альбумина 0,1 % и антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/мл; стрептомицин 0,1 мг/мл). К выращенной в биореакторе биомассе клеток Vero добавляли вирусосодержащую жидкость, заражающая доза при этом составила 0,2 ЛД₅₀ на 1 клетку. Культивирование вируса проводили при температуре 32 °С и рН 7,2 в течение 72 ч, затем вирусосодержащую суспензию собирали в стерильную посуду и инактивировали фенолом в конечной концентрации 0,5 % при 37 °С в течение 24 ч согласно действующим методическим указаниям МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства». Удаление клеточного дебриса осуществляли предварительным осаждением и фильтрацией жидкости через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,2 мкм. Вирусосодержащую жидкость концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации с помощью фильтрационной установки Vivaflow 200 («Sartorius», Германия), снаряженной полипропиленовой мембраной с номинальной отсечкой по молекулярной массе 300 кДа, с площадью фильтрации 0,2 м².

Полученный концентрат использовали для иммунизации лошадей – продуцентов антирабической сыворотки. В работе использовали лошадей, не бывших под другими видами иммунизации. Схема иммунизации обоснована результатами предыдущих экспериментов [2], а также рекомендациями отечественных и зарубежных исследователей [6, 8, 10, 13]. Иммунизацию лошадей проводили на протяже-

нии 11 недель с интервалом между первой и второй инъекциями 21 день, далее – с интервалом 7 дней. Первые пять инъекций проводили с использованием гидроксида алюминия (3 мг/мл) в качестве адьюванта. Затем использование адьюванта исключали. Введение антигена проводили внутримышечно. Объем иммунизирующей дозы был равен 5 мл с содержанием вируса бешенства 10⁸ ГЭ/мл, по данным ПЦР в режиме реального времени. Взятие крови для получения АИГ осуществляли через 10 дней после последней иммунизации.

Фракционирование гамма-глобулиновой фракции осуществляли риванол-спиртовым методом [3]. Осадок иммуноглобулина растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации белка 10,0 %. Остатки этанола удаляли диализом против 0,9 % раствора натрия хлорида. Для получения высокоочищенного раствора иммуноглобулина проводили предварительную фильтрацию через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,8 и 0,45 мкм, далее с целью улучшения показателей цветности и прозрачности осуществляли фильтрацию через глубинные фильтры Zeta Plus («CUNO», Франция). Стерилизующую фильтрацию раствора иммуноглобулина проводили с применением ацетатцеллюлозных мембран с диаметром пор 0,22 мкм.

Специфическую активность антирабической сыворотки и иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе [7] и *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [12]. Подсчет титра нейтрализующих антител проводили по методу Reed и Muench [12]. Физико-химические свойства иммуноглобулина исследовали согласно МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям».

Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятым методам [1].

Результаты и обсуждение

Состояние лошадей в течение всего срока иммунизации было удовлетворительным, антиген при внутримышечном введении не вызывал общих и местных побочных реакций.

Анализ специфической активности полученных антирабических сывороток показал положительную динамику образования антител (рисунок). К концу срока иммунизации титр антител в дот-иммуноанализе составил 1:1000, что явилось достаточным для завершения процесса иммунизации.

Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток к 11-й неделе после начала иммунизации была изучена *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах. По данным реакции нейтрализации, значения специфической активности иммунных сывороток составили 10 и 14 МЕ/мл (титр антител соответственно 1:554 и 1:692).

Для выяснения зависимости между нарастанием антител и процентным содержанием фракций

Характеристика физико-химических и биологических свойств АИГ из сыворотки лошади, иммунизированной культуральным рабическим антигеном

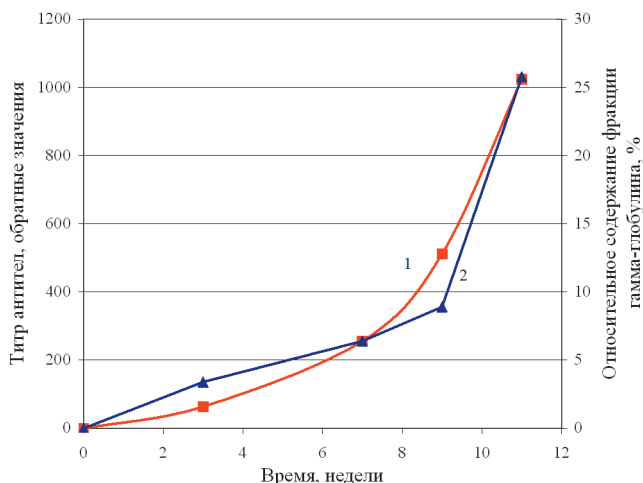
Показатель	Образец 01	Образец 02	Требования НД PN 002639/01-121011
Специфическая активность в реакции нейтрализации, МЕ/мл	242	214	Не менее 150
Специфическая активность в дот-иммуноанализе	1:10000	1:10000	–
Токсичность	Нетоксичен	Нетоксичен	Нетоксичен
Содержание белка, %	10,0	10,0	10,0±1,0
pH	7,0	7,1	7,0±0,4
Электрофоретическая чистота*	γ-глобулин – 91,66; α,β-глобулины – 8,34. Альбумин отсутствует	γ-глобулин – 91,67; α,β-глобулины – 8,33. Альбумин отсутствует	γ-глобулина – не менее 80; α,β-глобулины – не более 20. Альбумин должен отсутствовать
Прозрачность	0,03	0,05	Не более 0,05
Цветность	0,10	0,13	Не более 0,15

* Содержание α-, β-, γ-глобулинов указано в процентах.

белка в сыворотках, последние были исследованы методом электрофореза на ацетатных пленках. Электрофоретические исследования показали, что иммунологические сдвиги происходили с нарастанием гамма-глобулиновой фракции (рисунок). При исследовании образцов лошадиной сыворотки к концу иммунизации имело место увеличение содержания гамма-глобулинов на 25 % относительно исходного их содержания.

Выделенный из антирабической сыворотки специфический иммуноглобулин был изучен по основным биологическим и физико-химическим параметрам (таблица). Согласно требованиям нормативной документации PN 002639/01-121011, специфическая активность АИГ из лошадиной сыворотки должна быть не менее 150 МЕ/мл в реакции нейтрализации вируса бешенства в количестве от 100 до 1000 ЛД₅₀/0,03 мл. Уровень специфической активности образцов АИГ, полученных из экспериментальных образцов сыворотки крови лошади, составил 242 и 214 МЕ/мл (при титре антител соответственно 1:11987 и 1:11888).

Экспериментальный АИГ успешно прошел ис-



Динамика изменения специфической активности (1) и количества гамма-глобулиновой фракции (2) в антирабической сыворотке лошади в процессе иммунизации

пытания на токсичность, не оказывал повреждающего действия на организм экспериментальных животных: белых мышей и морских свинок.

Физико-химические показатели (содержание белка, pH, электрофоретическая чистота, прозрачность, цветность) также соответствовали требованиям нормативной документации, предъявляемым к коммерческому препарату гетерологичного АИГ.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены образцы АИГ из сыворотки лошадей, иммунизированных культуральным рабическим антигеном. Физико-химические свойства и уровень специфической активности исследуемых образцов удовлетворяют требованиям НД PN 002639/01-121011 на АИГ из сыворотки крови лошади жидкий. Результаты проведенных исследований доказывают возможность использования культурального рабического антигена в производстве антирабического иммуноглобулина. Применение культурального антигена в производстве гетерологичного АИГ позволит уменьшить вероятность развития побочных реакций у пациента, а также упростить рутинную процедуру иммунизации за счет значительного уменьшения объема вводимой дозы и сокращения общего количества инъекций.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д от 04.06.2012 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 180 с.
2. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В. и др. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. Пробл. особо опасных инф. 2012; 2(112):78–81.
3. Картов С.Н., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федорова Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.
4. Подчерняева Р.Я., Хижнянова Т.М., Михайлова Г.Р. Линия клеток Vero (B) для приготовления медико-биологических препаратов. Вопр. вирусол. 1996; 4:183–5.
5. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
6. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С. и др. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки.

Патент 2322503 РФ, опубл. 20.04.2008 г. Бюл. № 11.

7. Шарпова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):63–6.

8. Consales C.A., Valentini E.J.G., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A. et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. J. Biol. Stand. 1988; 16:27–32.

9. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. Biologicals. 2003; 31:233–236.

10. Lepine P., Atanasiu P. Производство лечебной антирабической сыворотки на животных. В кн.: Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975:295–300. [Production of therapeutic anti-rabies serum in animals. In: Laboratory Techniques in Rabies. Geneva: WHO; 1975:295–300].

11. Luekrajan T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of anti-rabies serum of equine origin. In: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.

12. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

13. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 2004. 15:49–54.

14. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004. 121 p.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 180 p.

2. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V. et al. [Production of rabbit anti-rabies immunoglobulin using cultural antigen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; 112:78–81.

3. Karpov S.N., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorova Yu.V. [Hyperimmune sera]. Tomsk; 1976. 380 p.

4. Podchernyaeva R.Ya., Khizhnyanova T.M., Mikhailova G.R. [Vero cell line (B) for the production of medico-biological preparations]. Vopr. Virusol. 1996; 4:183–5.

5. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.

6. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S. et al. [Method of Obtainment of Highly Specific Heterologous Anti-Rabies Serum]. RF Patent 2322503.

7. Sharпова 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. et al. [Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot-immunoassay]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:63–6.

Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 01.11.12.