

На правах рукописи

МУХАМЕДЖАНОВА АНТОНИНА ГЛЕБОВНА

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ
ВЫСОКООЧИЩЕННОГО АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА ДЛЯ
ЭКСПРЕСС-ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ИФА И МФА**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Казань – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань).

Научный руководитель

Чернов Альберт Николаевич
доктор биологических наук

Официальные оппоненты

Сочнев Василий Васильевич
доктор ветеринарных наук, профессор,
заведующий кафедрой эпизоотологии,
паразитологии и ветсанэкспертизы ФГБОУ
ВО «Нижегородская государственная
сельскохозяйственная академия»

Литенкова Ирина Юрьевна
кандидат ветеринарных наук, руководитель
службы развития ФКП «Щёлковский
биокомбинат»

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Федеральный центр охраны
здоровья животных»

Защита диссертации состоится «27» декабря 2019 года в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, д. 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана» и на сайте <http://www.kazvetakademия.рф>.

Автореферат разослан « » 2019 г. и размещен на сайтах:
<http://www.vak.ed.gov.ru> и <http://www.kazvetakademия.рф>.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Г. Р. Юсупова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день бешенство – природно-очаговое особо опасное смертельное инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства RABV семейства Rhabdoviridae, продолжает занимать одно из ведущих мест среди зооантропонозных инфекционных заболеваний (Мамунц А.Х., 2018; Мовсесянц А. А., 2019). Неблагополучная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация регистрируется более чем в 160 странах мира (Заволока А. А., 2013). Основной ущерб, наносимый данным заболеванием, складывается из убытков, связанных с гибеллю животных и людей, затрат на профилактические и противоэпизоотические мероприятия, а также на диагностические средства (Метлин А. Е., 2008). Необходимость постоянного мониторинга природных очагов бешенства и расширения исследовательской деятельности по усовершенствованию средств оральной вакцинации диких животных, в свою очередь, требует совершенствования экспресс-методов индикации вируса бешенства (Гулюкин А. М., 2014).

Наиболее точными и чувствительными методами индикации антигена ВБ, получившими широкое распространение, являются иммуноферментный анализ (ИФА) и метод флуоресцирующих антител (МФА) (Katayama S. et al, 1998; Madhusudana S., 2008; Realegeno S. et al., 2008). Уровень чувствительности и специфичности тест-систем, производимых на их основе, определяется в первую очередь степенью очистки специфических компонентов – рабиических антигенов и антирабических иммуноглобулинов. Возможность проведения потоковых исследований по индикации антигена вируса бешенства в патологическом материале с использованием подобных высокоочищенных компонентов имеют только крупные научно-исследовательские учреждения, что связано с недостаточной степенью разработанности и внедрения методик их получения.

Степень разработанности проблемы. Методикам получения рабиического антигена посвящены работы ряда зарубежных (Fu Z. F. et al., 1991; Mahshid D. et al., 2014; Yan L. et al., 2017) и отечественных авторов (Ефимова

М. А., 2017; Стародубова Е. С., 2015; Турсунов К., 2015; Шарапова Н. А., 2012). Классические технологии получения очищенных антигенных компонентов ВБ связаны с выделением гликопротеина – наиболее мощного иммуногена, определяющего типовую специфичность рабдовирусов (Грибенча С. В., 2012), что, предполагает решение двух основных проблем: дезинтеграции вирусных частиц и очистки антигенных эпитопов от субвирусных компонентов. Однако практикуемые в настоящее время алгоритмы выделения АГ ВБ при помощи классических биохимических методов имеют ряд существенных недостатков, главным из которых является содержание минорных полипептидных примесей в конечном продукте. В связи с этим целесообразной является разработка комбинированных методик получения высокоочищенного АГ ВБ, пригодного для получения искомого антигенного продукта в промышленных масштабах, включающие поэтапный контроль чистоты компонентов, а также оценить возможность применения данных методик для конструирования соответствующих диагностикумов.

Цель и задачи. Основной целью работы явилась разработка способов получения высокоочищенного антигена вируса бешенства для экспресс-тест-систем на основе ИФА и МФА и комплексная оценка его диагностической и иммуногенной эффективности. Для достижения указанной цели были обозначены следующие задачи:

1. Получить антиген вируса бешенства модифицированным методом ультрацентрифугирования с разделением в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и последующей хроматографической очисткой;
2. Выделить антиген вируса бешенства методом трёхфазной экстракции с последующим переосаждением этанолом;
3. Оценить в сравнительном аспекте серологическую активность выделенных антигенных фракций;
4. Разработать схему иммунизации лабораторных животных высокоочищенным АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ);

5. Получить высокоспецифичные монофракционные ФИТЦ-конъюгированные антирабические иммуноглобулины и определить их диагностическую эффективность для детекции антигенов эпизоотических штаммов ВБ в патологическом материале.

Научная новизна. Выявлены особенности антигенного профиля ВБ, штамм «Овечий» ГНКИ, с использованием методик аналитического дис-электрофореза и белкового вестерн-блота.

Впервые разработаны и апробированы в производственных условиях способы получения высокоочищенного АГ ВБ, характеризующегося наличием единственной полипептидной фракции молекуллярной массой 67 кДа и отсутствием минорных белков.

Оценена возможность использования выделенного монофракционного АГ ВБ в качестве иммуногена в схемах гипериммунизации лабораторных животных для получения высокоспецифичных антирабических иммуноглобулинов.

Доказана высокая диагностическая активность антигенных фракций и выделенных на их основе иммуноглобулинов в качестве специфических компонентов экспресс-тест-систем на основе ИФА и МФА.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящее исследование имеет выраженное прикладное значение и направлено на разработку современных биотехнологических решений по оптимизации существующих способов выделения высокоочищенных антигенов вируса бешенства, позволяющих в перспективе решить проблему обеспечения ветеринарных лабораторий высокоспецифичными диагностическими тест-системами, что способствует повышению эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Предложены альтернативные методы выделения антигенных фракций, содержащих гликопротеин ВБ. Определены приёмы, позволяющие сохранить большую часть диагностически значимого антигенного материала и освободиться от основной массы балластных белков. Антигены ВБ «Овечий»

ГНКИ (67 кДа), а также специфичные к ним иммуноглобулины внедрены в производство экспресс-тест-систем на основе ИФА и МФА, необходимых ветеринарной лабораторной практике для эффективной и точной диагностики бешенства, а также для совершенствования комплекса мер по борьбе и ликвидации с рабической инфекцией.

На основании проведённых исследований разработан «Лабораторный регламент по производству высокоочищенного антигена вируса бешенства», утверждён директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 05.12.2018.

Разработанные методы применяются в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» для производства компонентов соответствующих диагностических тест-систем.

Методология и методы исследования. В работе применяли биохимические, вирусологические, серологические и культуральные методы исследования, использовали методы вирусовыделения с использованием головного мозга белых мышей и овец, реакцию нейтрализации на белых мышах, методы аналитического disc-электрофореза, вестерн-блоттинга, методы хроматографической очистки и гель-фильтрации, иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализы и др.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. При очистке цельновирионного ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ) модифицированным методом ультрацентрифугирования с градиентным разделением и последующей гель-фильтрацией в конечном продукте обнаружаются две мажорные полипептидные фракции, соответствующие G- и N-белкам вируса бешенства.

2. Трёхкратное озвучивание УЗДН и осаждение этанолом антигенсодержащего материала, полученного на основе трёхфазной экстракционной системы, позволяет получить монофракционный препарат с единственным полипептидом, соответствующим гликопротеину ВБ, и приводит к повышению его серологической активности.

3. Иммунизация высокоочищенным АГ ВБ инициирует достижение титра антител в сыворотках крови кроликов 1:20480; глобулиновый препарат

содержит единственную полипептидную фракцию, соответствующую антигенному детерминанту иммунизирующего материала.

4. Модифицированные методики очистки белков позволяют получить из цельновирионного ВБ «Овечий» ГНКИ антигенные препараты, обладающие высокой диагностической эффективностью и строгой специфичностью в ИФА и МФА.

Степень достоверности и апробация результатов. Для получения результатов высокой степени достоверности все эксперименты, представленные в диссертационной работе, были проведены в трёх-пяти повторностях.

Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции «Современные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации в АПК», посвящённой 145-летию Казанской ГАВМ (г. Казань, 2018); на научно-практической конференции «Актуальные проблемы аграрной науки Республики Татарстан», посвящённой международному «Дню поля» (г. Казань, 2018); на Международной научно-практической конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», посвящённой 100-летию Орловской биофабрики (г. Орёл, 2018); на V Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции «Особо опасные и социально значимые инфекции» (г. Сочи, 2018); на Международной научно-практической конференции «Перспективы российской ветеринарной науки, посвящённой 60-летию ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, 2018), а также неоднократно докладывались на тематических заседаниях по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» за 2017-2019 гг.

Публикации результатов исследований. По теме диссертационной работы опубликовано 11 научных статей, в том числе 4 статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 3 статьи – в изданиях, включённых в базы данных Scopus и Web of Science.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 134 страницах компьютерного текста. Список литературы включает 57 отечественных и 146 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 24 рисунками.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в период с 2017 по 2019 гг. в лаборатории иммунологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» («ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) согласно тематическому плану НИР по заданию 3.5: «Биологическая безопасность» (№ госрегистрации 01200202604).

Исследования проводились с использованием производственного штамма вируса бешенства «Овечий» (ГНКИ), фиксированного референтного штамма вируса бешенства «CVS», а также вакцинных и эпизоотических штаммов вируса бешенства.

В экспериментах использовали естественно восприимчивых и лабораторных животных: белых мышей инбредной линии BALB/c ($n=350$), мышат-сосунов ($n=100$), овец ($n=8$), ягнят в возрасте 2 месяцев ($n=4$), кроликов ($n=25$).

В рамках скрининговых исследований по определению антигена вируса бешенства использовались пробы головного мозга лисиц, отстрелянных на неблагополучных по бешенству территориях Республики Татарстан ($n=20$), а также пробы головного мозга интактных животных разных видов ($n=25$): овец ($n=5$), кроликов ($n=5$), белых мышей ($n=15$).

Для очистки и концентрирования вируссодержащей мозговой сусpenзии применяли предварительную дезинтеграцию на приборе FastPrep-24 (MP Biomedicals) с использованием однородных частиц карбида кремния, трёхкратное озвучивание на ультразвуковом диспергаторе, низкоскоростное

центрифугирование и ультрацентрифугирование. Для визуализации материала использовали методы электронной микроскопии.

Для выделения антигена вируса бешенства использовались методы разделения вируссодержащего материала в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с последующим ультрацентрифугированием и хроматографической очисткой, а также метод трёхфазной экстракции с последующим переосаждением этанолом и насыщенным раствором сульфата аммония. Поэтапный контроль чистоты и серологической активности продукта на каждой стадии очистки осуществляли методами аналитического disc-электрофореза в поликариламидном геле, белкового вестерн-блота, а также методами ИФА и МФА по ГОСТу 26075-13 с использованием соответствующих наборов: «Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) и «Флуоресцирующего антирабического глобулина» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) согласно инструкциям по применению.

Гипериммунизацию лабораторных животных производили методом последовательного пятикратного введения инактивированного антигена с интервалом 14 суток; белковые профили полученных сывороток определяли при помощи стрипового вестерн-блота. Концентрирование сывороток крови иммунизированных животных производили при помощи трёхкратного переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония и последующей двухэтапной хроматографической очисткой. Мечение иммуноглобулинов флуоресцеин-5-изотиоцианатом («Merck») производилось методом конъюгации с последующим удалением несвязавшегося красителя достигалось гель-фильтрацией на колонках с использованием геля сепадекс G-25. Активность и специфичность меченых γ -глобулиновых фракций определяли в МФА по вышеизложенному алгоритму. Определение титров АГ ВБ в 10% суспензиях мозговой ткани на изотоническом растворе хлорида натрия осуществляли методом «сэндвич»-ИФА на полистироловых планшетах, предварительно сенсибилизованных антирабическими иммуноглобулинами.

Контрольным тестом служила реакция нейтрализации (РН), воспроизводимая на белых мышах методом последовательных десятикратных разведений.

Статистическую обработку числовых данных, полученных в процессе выполнения диссертационной работы, осуществляли посредством пакетов программ Microsoft Excel 2016 и STATISTICA 12.0 (StatSoft) на основе методов вариационной и описательной статистики.

Общая архитектоника научных исследований по теме диссертационной работы приведена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Общая схема исследований

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Разработка модифицированного метода получения антигена вируса бешенства

Основными требованиями, предъявляемыми к диагностическим антигенам, являются их способность к сорбции на поверхности полистирола, гомогенность, которая определяет связываемость антигенного монослоя с твёрдой фазой, а также сохранение свойств при лиофилизации и длительном хранении. Описанной ниже способ выделения антигена производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ основан на дезинтеграции клеточной массы мозговой суспензии, ультрацентрифугировании, разделении в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и последующем удалении балластных белков при помощи гель-фильтрации обогащённого вирусодержащего материала посредством высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) среднего давления.

После окончания ультрацентрифугирования в преформированном 10-60% градиенте сахарозы было отобрано 7 основных антигенных фракций, в которых методом электронной микроскопии были идентифицированы дефектные интерферирующие частицы (ДИЧ) вируса бешенства. Согласно результатам вестерн-блоттинга после проведения хроматографической очистки, наибольшая серологическая активность регистрировалась в антигенной фракции № 3, соответствующей зоне сахарозы до 30% (рисунок 2).

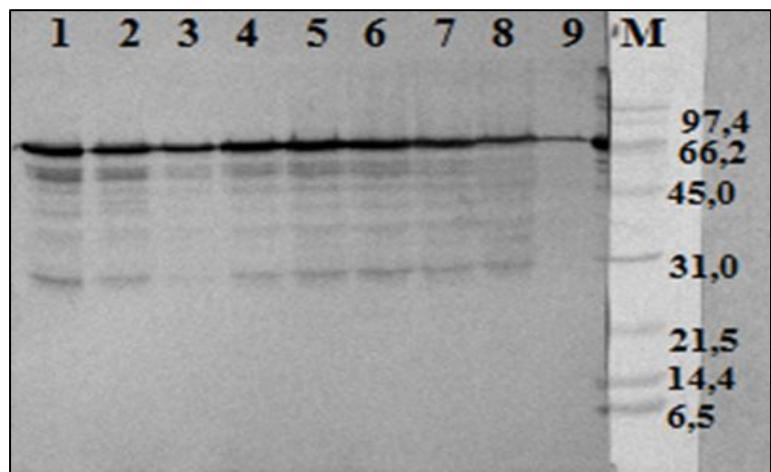


Рисунок 2 – Вестерн-блоттинг на нитроцеллюлозной мемbrane вирусного материала, разделённого по плавучей плотности в ступенчатом градиенте сахарозы. Треки: 1 – исходный вирусный материал (осадок), полученный после УЦФ при 37000 g; 2 – фракция АГ № 1 (<10% сахарозы); 3 – фракция АГ № 2 (10-20% сахарозы); 4 – фракция АГ № 3 (20-30% сахарозы); 5 – фракция АГ № 4 (30-40% сахарозы); 6 – фракция АГ № 5 (40-50% сахарозы); 7 – фракция АГ № 6 (50-60% сахарозы); 8 – фракция АГ № 7 (>60% сахарозы); 9 – дополнительная осадочная фракция; 10 – маркер молекулярных масс Bro Range («Bio-Rad»).

Согласно представленному белковому профилю (рис. 3), в материале обнаруживается одна мажорная белковая фракция молекулярной массой 662,-67,0 кДа, что соответствует молекулярной массе гликопротеина ВБ (66 кДа), а также 4 минорные группы белков, локализующиеся в диапазонах 27,0-30,0 кДа, 35,0-40,0 кДа, 50,0-55,0 кДа (соответствующем молекулярной массе нуклеопротеина ВБ (55 кДа), 105,1-116,2 кДа.

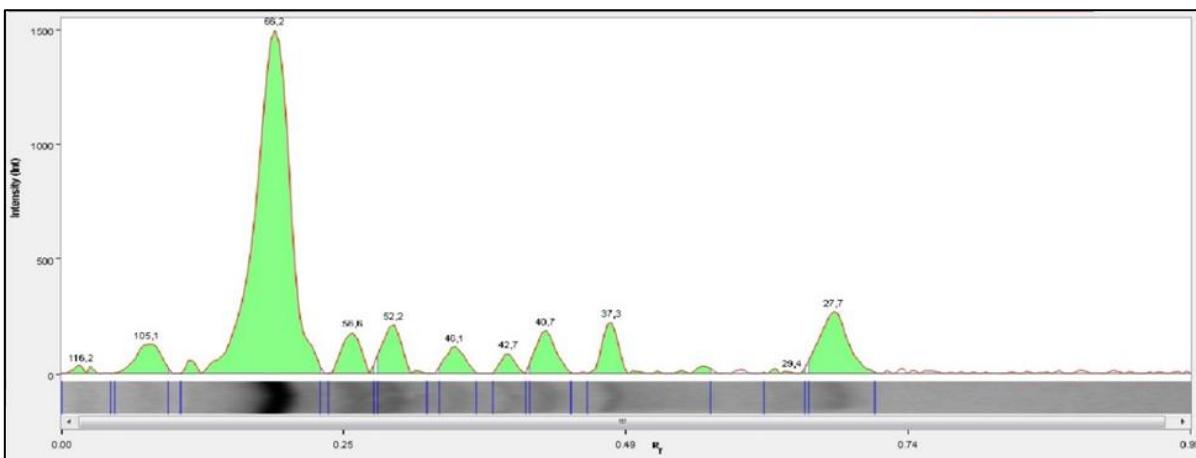


Рисунок 3 – Денситограмма с НЦМ фракции АГ № 3 (вирусного материала, отобранного с 20-30% зоны сахарозы).

Согласно исследованиям активности и специфичности данного материала в ИФА, его оптическая плотность в наибольшем разведении составила $0,957 \pm 0,023$ ОЕ, что превышает таковую исходного вирусного материала в 1,42 раза ($p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемый метод концентрирования и градиентного разделения ВСМ позволяет получить продукт, содержащий в качестве мажорных наиболее антигенные белковые структуры ВБ. Однако наличие балластных белков в вышеперечисленных областях может существенно понизить степень специфичности выделенной фракции, в связи с чем был изыскан способ её дополнительной очистки.

2.2.2 Получение антигена вируса бешенства методом трёхфазной экстракции

Общеизвестным является положение о том, что при выделении антигенных компонентов методом ультрацентрифугирования невозможно получить мономерный препарат. Получение высокоочищенного антигенного препарата возможно только при повторном суспендировании первичных осадков и их переосаждении. Оптимальной альтернативой модифицированному способу ультрацентрифугирования является химический метод очистки,

который способен обеспечить более полную седиментацию вирусных частиц, имеющих наименьшую плотность.

В качестве исходного материала для создания экстракционной системы послужил надосадок 20% мозговой суспензии, ресуспендированный в 2 М растворе сульфата аммония ($pH=5,4\pm0,1$) и бутаноле-1 в соотношении 1:4:4. По истечению инкубации наблюдалась следующая картина: между бутанольной (верхней) и сульфат-аммонийной (нижней) фазами образовалась зона плотной взвеси в виде таблетки, также наблюдалось выпадение дополнительного осадка на дне пробирки. На основе распределения фаз было сделано предположение, что наибольший интерес относительно концентрации преципитированных белков представляет экстрагированная взвесь, которую отобрали путём последовательного удаления жидких фаз прокалыванием пробирок. В целях более интенсивного разрушения остатков клеточного дебриса и высвобождения вирионов трижды применяли метод трёхкратного озвучивания на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в следующем режиме: продолжительность озвучивания – 40 с, интервал между обработками – 60 с, частота колебаний – 95 кГц.

Результаты электрофоретического анализа показали значительную эффективность применения озвучивания на диспергаторе и последующего низкоскоростного центрифугирования для очистки материала от балластных веществ. Так, наибольшая серологическая активность по-прежнему определяется группами белков с молекулярными массами 60,0-67,2 кДа и 50,0-55,0 кДа; дополнительная активность прослеживается в зоне 28,0-30,0 кДа.

Установлено, что на данном этапе очистки на денситограмме регистрируется порядка 15-17 пиков минорных фракций, однако их содержание в общем объёме образца не укладывается в диапазон статистической значимости. Оптическая плотность данного материала в рабочем разведении (1:2560) составила $0,792\pm0,024$ ОЕ, что превышает данный показатель образца без обработки в 1,94 раза ($p<0,05$), а титр активности был оценен как 1:10240 ($K_{sp}=3,4$).

Последующее осаждение белков из антигенных фракций было произведено при помощи 96% этанола, что позволило выделить дополнительные осадочные фракции (рисунок 4).

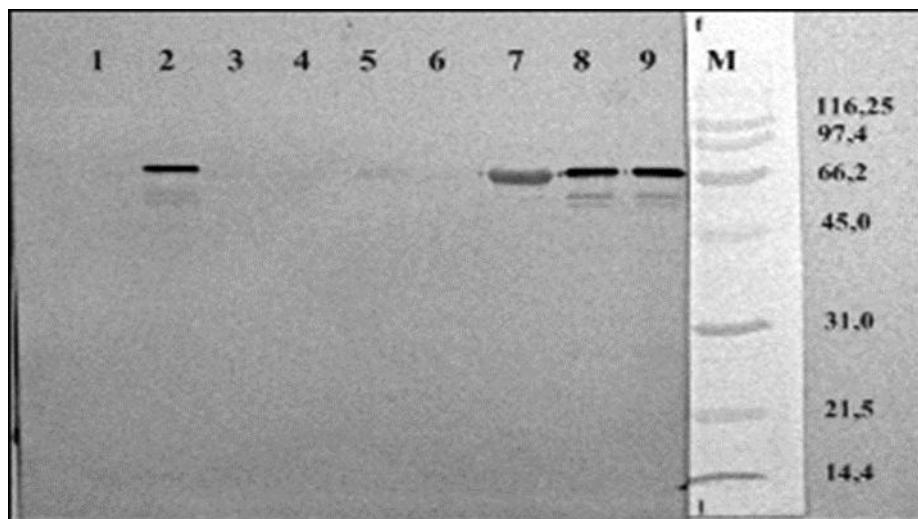


Рисунок 4 – Электрофореграмма после переноса на НЦМ антигенсодержащего материала после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т, полученного в процессе осаждения химически активными веществами. Треки: 1 – осадок экстрагированной промежуточной взвеси; 2 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V этанола; 3 – ВСМ, полученный при осаждении 0,5 V НСА; 4, 5, 6 – ВСМ, полученный при осаждении бутанольной фазы 1 V этанола; 7 – вакцина «Nobivac Rabies»; 8, 9 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V НСА; М – маркер молекулярных масс Broad Range («Bio-Rad»).

Таким образом, результаты вестерн-блоттинга с гипериммунной кроличьей сывороткой подтверждают серологическую активность фракции АГ ВБ, подвергнутой трёхкратному озвучиванию и осаждённой этанолом (трек 2). Очевидно, что переосаждение позволило получить высокоочищенный мономерный продукт, содержащий единственную полипептидную фракцию молекулярной массой 67,2 кДа (рисунок 5).

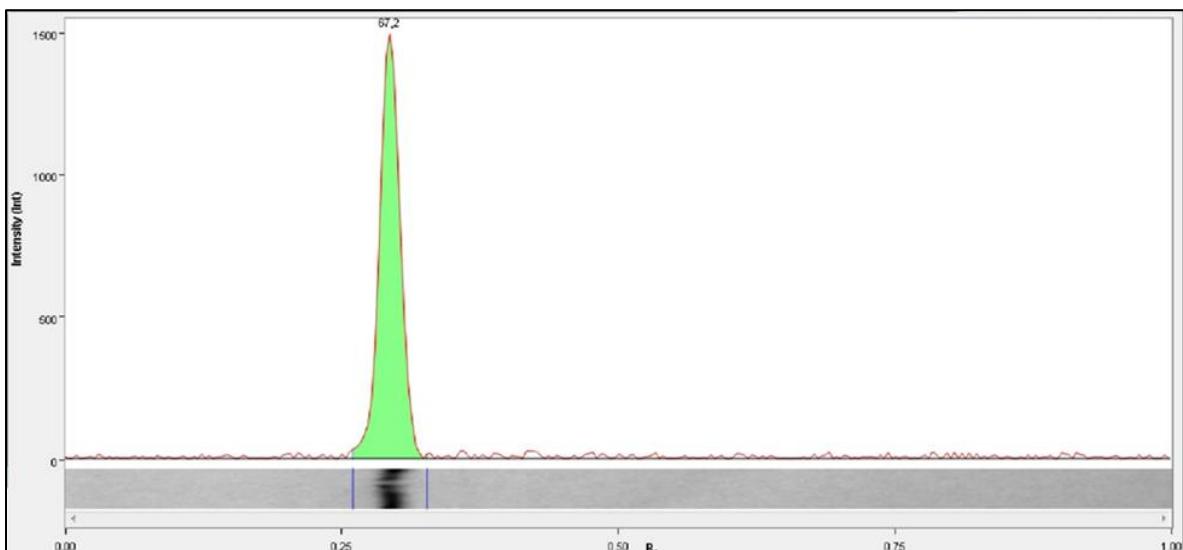


Рисунок 5 – Денситограмма антигенной фракции, полученной путём трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т и последующего осаждения этанолом (1:1).

Таким образом, применение методик переосаждения антигенсодержащего материала химически активными веществами позволило существенно сократить содержание минорных полипептидов, не вызывающих образование вируснейтрализующих антител.

2.2.3 Разработка схем гипериммунизации лабораторных животных высокоочищенным АГ ВБ

На наш взгляд, наиболее удовлетворяющей требованиям, предъявляемым к иммунизирующему антигену, явилась фракция, полученная методом трёхфазной экстракции с последующим осаждением этанолом в соотношении 1:1. Данная фракция с концентрацией белка $0,924 \pm 0,049$ мг/мл и титром активности в ИФА 1:81920 и содержащая, согласно результатам вестерн-блоттинга, единственный полипептид молекулярной массой 67,2 кДа, являющийся гликопротеином ВБ и обладающий потенциально высокой иммуногенной активностью.

Для получения высокоактивных и специфичных сывороток против АГ ВБ, полученного из штамма «Овечий» ГНКИ, разработали следующую схему

иммунизации. Кроликов первой группы массой 2,7-3,5 кг (n=5) иммунизировали внутрикожно многоточечно вдоль позвоночного столба (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку инъецировали по 0,1 мл антигенного материала, подготовленного из расчёта: 0,1 мл экстрагированной фракции АГ ВБ, осаждённой этанолом, 0,4 мл изотонического раствора натрия хлорида, 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Через 6-8 недель проводили бустерную иммунизацию; при подготовке антигенного материала использовали неполный адьювант Фрейнда (НАФ). Последующие две иммунизации производили аналогично с сохранением дозы антигена с интервалом в 14 суток; заключительную, пятую, иммунизацию осуществляли со снижением дозы вдвое. Изучение эффективности разработанной схемы иммунизации высокоочищенным АГ ВБ проводили в сравнительном аспекте со схемами иммунизации промышленными антирабическими вакцинами, используемыми ранее при наработке гипериммунных сывороток («Nobivac Rabies», «Рабивак»).

По результатам исследования, наибольшей интенсивности антителогенез достигал к 74 дню эксперимента. Наибольший конечный титр регистрировался в группе животных, иммунизированных высокоочищенным АГ ВБ (1:20480), при иммунизации вакциной «Nobivac Rabies» – 1:10240, вакциной «Рабивак» – 1:2560.

Таким образом, можно утверждать, что нами разработана схема гипериммунизации животных-продуцентов высокоочищенным АГ ВБ, которая позволяет получить сыворотку с титром антител не ниже 1:20480, что превышает титры, получаемые при использовании схем с вакцинами «Nobivac Rabies» и «Рабивак» в 2 раза и в 10 раз соответственно. Превалирующая полипептидная фракция в конечной сыворотке, полученной на высокоочищенный АГ ВБ, имеет молекулярную массу 66,2-68,2 кДа, что подтверждает выдвинутое нами предположение о возможности получения глобулиновой фракции, соответствующей G-белку ВБ. Имеющиеся титры антител вкупе с удовлетворительными показателями ОП исследуемых образцов

явились основанием для использования сывороток в качестве сырья для изготовления высокоочищенных диагностических иммуноглобулинов.

2.2.4 Получение высокоспецифичных антирабических ФИТЦ-иммуноглобулинов для экспресс-тест-систем на основе МФА

В процессе трёхкратного переосаждения исходной гипериммунной кроличьей сыворотки насыщенным раствором сульфата аммония, промывкой осадка 2,78 М раствором сульфата аммония и исчерпывающим диализом против 0,025 М трис-HCl буфера с pH 7,8 были получены общие (суммарные) иммуноглобулины (IgG), концентрация которых составила $39,8 \pm 1,71$ мг/мл. Анализом белкового спектра данного препарата в 7,5% ПААГ было подтверждено содержание в нём высококонцентрированных иммуноглобулинов с минимальными примесями вторичных белков.

Конъюгацию глобулинов с ФИТЦ осуществляли методом длительного маркирования. Активность и специфичность полученного препарата испытывали на мазках-отпечатках, приготовленных из четырёх отделов головного мозга (продолgovатого мозга, мозжечка, гиппокампа и коры больших полушарий) мышей, заражённых ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ). В качестве материала, содержащего гетерологичные антигенные комплексы, служили мазки-отпечатки, приготовленные по аналогичной методике из головного мозга мышей, заражённых вирусом болезни Ауески (штамм «Арский», инфекционный титр 3 lg LD₅₀/0,03 мл). ФАГ наносили на высушенные мазки в разведениях 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; отрицательными контролями служили мазки, окрашенные в соответствующих разведениях КФГ и АнГ.

В результате исследований была показана возможность использования высокоспецифичных сывороток крови, полученных при гипериммунизации кроликов высокоочищенным АГ ВБ, в качестве сырья для изготовления ФИТЦ-конъюгированных иммуноглобулинов для тест-систем на основе МФА. Посредством сульфат-аммонийной преципитации пула исходных гипериммунных сывороток были получены суммарные иммуноглобулины с

концентрацией белка $39,8 \pm 1,71$ мг/мл. Данный промежуточный препарат характеризовался достаточно высокой активностью в ИФА (до 1:40960 с ОП= $2,217 \pm 0,181$ ОЕ в рабочем разведении) и специфичностью, выражавшейся в отсутствии реакции с гетерологичным АГ, что послужило основанием для его последующей маркировки.

В результате конъюгации с ФИТЦ нами были получены образцы ФАГ с плотностью мечения, составлявшей 14,4 г/см³. Титр рассматриваемых ФАГ в МФА составил 1:64; в качестве рабочего разведения нами было определено 1:32 как обеспечивающее наибольшую степень флуоресценции (4+) при наименьшей фоновой активности. При окраске мазков-отпечатков, приготовленных из проб головного мозга мышей, содержащих комплексы гомологичного и гетерологичного антигенов, ФАГ в указанном разведении характеризовался точной индикацией комплексов АГ ВБ и отсутствием неспецифических реакций с АГ вируса болезни Ауески.

Вышеперечисленные свойства ФИТЦ-конъюгированных иммуноглобулинов делают их пригодными для производства специфических компонентов тест-систем на основе МФА, что, в свою очередь, доказывает способность высокоочищенного АГ ВБ к индукции иммунного ответа на конкретные антигенные структуры.

2.2.5 Оценка диагностической эффективности высокоочищенных антирабических иммуноглобулинов в «сэндвич»-ИФА

Для определения содержания АГ ВБ в патологическом материале нами были происследованы в «сэндвич»-ИФА 10% суспензии мозговой ткани лисиц, отстрелянных в неблагополучных по бешенству районах РТ (n=20), показавшие положительные результаты в МФА (1-4+). Постановка ИФА осуществлялась в определённых выше условиях с использованием специфического антивидового конъюгата в рабочем разведении. Для сравнительного анализа преципитирующих качеств иммуноглобулинов отобранные мозговые суспензии исследовали на планшетах, сенсибилизованных в аналогичных

концентрациях по белку суммарными иммуноглобулинами, полученными в результате иммунизации кроликов вакциной «Рабивак». В качестве отрицательного контроля использовали мозговую супензию лисицы, отрицательную в МФА; в качестве контрольного теста для верификации результатов ИФА проводили РН на белых мышах методом последовательных десятикратных разведений.

Из данных таблицы видно, что сопоставимость результатов в ИФА с высокоспецифичным иммуноглобулином и МФА составила 100,0%, тогда как с суммарным иммуноглобулином, полученным на вакцину «Рабивак» – 89,4%, что свидетельствует о способности иммуноглобулина, полученного на высокоочищенный АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ), к индикации АГ ВБ в слабоположительных пробах.

При тестировании высокоспецифичного иммуноглобулина все положительные в МФА пробы являлись положительными в ИФА; уровень ОП проб зависел от концентрации АГ ВБ в мозговой ткани. Диапазон ОП для положительных в МФА проб составил 0,479-1,675 ОЕ, для слабоположительных – 0,279-0,392 ОЕ, для сомнительных – 0,235-0,257 ОЕ. Минимальная концентрация АГ ВБ, соответствующая наименьшему положительному результату определения, составила $0,246 \pm 0,021$ ОЕ, что эквивалентно титру вируса $4,1 \pm 0,05$ ($p=0,001$) lg LD₅₀/см³.

При сравнительном исследовании материала в РН была выявлена значительная положительная корреляция с результатами ИФА с использованием высокоспецифичного иммуноглобулина ($r=0,89$, $p<0,001$).

Следует отметить, что постановку «сэндвич»-ИФА осуществляли в пяти повторах; при этом коэффициент вариации среди аналогичных лунок разных планшетов не превышал $3,7 \pm 0,19\%$, что свидетельствует о высокой воспроизводимости полученных результатов.

Таким образом, в результате анализа характеристик высокоспецифичного иммуноглобулина, полученного методом трёхкратного высаливания НСА сывороток крови кроликов, иммунизированных высокоочищенным АГ ВБ

(«Овечий» ГНКИ), было показано, что разработанный алгоритм получения иммуноглобулинов позволяет наработать мономерный продукт с минимальным количеством вторичных примесей, обеспечивающий оптимальную связываемость с рабочими антигенами. В процессе оптимизации постановки ИФА были определены условия, позволяющие получить достоверные результаты с высокой степенью воспроизводимости. При изучении диагностической эффективности выделенных иммуноглобулинов для детекции АГ ВБ в патологическом материале было установлено, что путём сенсибилизации планшетов высокоспецифичными иммуноглобулинами чувствительность тест-системы повысилась на 10,6%, что существенно увеличивает возможность детекции АГ ВБ в малых концентрациях и напрямую влияет на правильность выставления лабораторного диагноза.

З ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы были определены методические подходы к выделению и наработке серологически активных антигенов ВБ «Овечий» ГНКИ, которые используются в производстве и комплектации экспресс-тест-систем для диагностики бешенства, разрабатываемых на основе ИФА и МФА, и сделаны следующие выводы:

1. Предлагаемый модифицированный метод ультрацентрифугирования с разделением в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и последующей очисткой методом гель-фильтрации позволяет получить антиген вируса бешенства, содержащий белки G и N, с титром в ИФА до 1:40280 и оптической плотностью $1,892 \pm 0,141$ ОЕ, что обеспечивает оптимальную детекцию ферментативной метки при постановке реакции. Установлено, что подобная активность позволяет повысить выход лиофилизированного антигена в 8,3 раза.

2. Разработан и внедрён в производственную практику метод трёхфазной экстракции с трёхкратным озвучиванием УЗДН и последующим осаждением этанолом, позволяющий получить антигенный продукт, содержащий единственную полипептидную фракцию (67,0 кДа), с титром в ИФА до 1:80490

и оптической плотностью до $2,137 \pm 0,215$ ОЕ, по специфичности превосходящий исходный антиген (супернатант).

3. Разработаны схемы гипериммунизации кроликов с использованием высокоочищенных АГ ВБ, позволяющие получить высокоспецифичную гипериммунную сыворотку с титром в ИФА до 1:20480.

4. Отработан методический подход к наработке высокоспецифичных монофракционных ФИТЦ-конъюгированных иммуноглобулинов с титром в МФА 1:32. Предложенная схема очистки иммуноглобулинов обеспечивает высокую специфичность индикации антигена вируса бешенства и отсутствие неспецифической флуоресценции в рабочем разведении.

5. Определены условия постановки ИФА и МФА с полученными высокоочищенными специфическими компонентами; подтверждена высокая диагностическая эффективность иммуноглобулинов для индикации антигенов эпизоотических штаммов ВБ в патологическом материале, что позволяет значительно повысить точность и чувствительность исследуемых методов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Внедрить предложенные научно-методические подходы к получению высокоочищенного антигена вируса бешенства в производство антигенных компонентов для экспресс-тест-систем на основе ИФА и для целей потокового скрининга уровней антирабических вируснейтрализующих антител у животных, иммунизированных против бешенства.

2. Учитывать разработанные схемы гипериммунизации высокоочищенным АГ ВБ для получения высокоспецифичной сыворотки и последующего производства глобулиновых препаратов для экспресс-тест-систем на основе МФА.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мухамеджанова, А. Г.** Обзор современных методов лабораторной диагностики бешенства / А.Г. Мухамеджанова, А.Н. Чернов, М.А. Ефимова // Ветеринария. – 2018. – № 7. – С. 29-32.*
2. **Мухамеджанова, А. Г.** Иммунохимическая характеристика отдельных фракций антирабических иммуноглобулинов / А.Г. Мухамеджанова, М.А. Ефимова, А.Н. Чернов и др. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Современные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации в АПК», посвященной 145-летию Академии. – Казань: Казанская ГАВМ, 2018. – С. 111-116.
3. Ефимова, М.А. Оценка пригодности выделенных антирабических иммуноглобулинов для методов лабораторной диагностики: ИФА и МФА / М. А. Ефимова, **А. Г. Мухамеджанова**, А. Н. Чернов и др. // Ветеринарный врач. – 2018. – № 4. – С. 3-7.*
4. Ефимова, М.А. Получение антирабических глобулинов и оценка их серологической активности / М. А. Ефимова, А.Н. Чернов, Х.Н. Макаев, **А. Г. Мухамеджанова** и др. // Актуальные проблемы аграрной науки Республики Татарстан: материалы Республиканской научно-практической конференции (28 июня 2018 г., г. Казань). – Казань: Издательство Казанского ГАУ, 2018. – С. 26-32.
5. Чернов, А.Н. Эпизоотические особенности проявления бешенства в Российской Федерации и совершенствование мер борьбы с рабицкой инфекцией / А.Н. Чернов, **А.Г. Мухамеджанова** // Материалы V Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием (30 октября 2018 г., г. Сочи). – Краснодар: ООО «Типография Б+», 2018. – С. 79-81.
6. **Мухамеджанова, А. Г.** Получение антигена вируса бешенства и оценка его активности и специфичности / А. Г. Мухамеджанова, М. А. Ефимова, А. Н. Чернов, К. С. Хаертынов, Р. М. Ахмадеев // Учёные записки Казанской

государственной академии ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана. - 2018. - Т. 236 (IV). - С. 138-142.*

7. Чернов, А. Н. Оценка диагностической эффективности выделенных антирабических антигенов / А. Н. Чернов, **А. Г. Мухамеджанова** // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: Материалы международной научно-практической конференции, посвящённой 100-летию Орловской биофабрики. – 2018. – С. 75-79.

8. Nadyrova, A. I. Obtaining of highly purified fractions of rabies virus antigen / A. I. Nadyrova, **A. G. Mukhamedzhanova**, A. N. Chernov et al. // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 12, Issue 4. – PP. 1299-1303.**

9. Efimova, M. A. Optimization of the conditions for preparation of antirabic diagnostic globulins / M. A. Efimova, **A. G. Mukhamedzhanova**, K. S. Khaertynov et al. // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2018. – Vol. 12, Issue 4. – PP. 1384-1389.**

10. **Мухамеджанова, А.Г.** Диагностическая эффективность рабического антигена для индикации постvakцинальных антител / А. Г. Мухамеджанова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2018. – № 4. – С. 31-34.*

11. Astrakhantsev, V.A. Epizootological monitoring and control measures against rabies in Moscow region / V.A. Astrakhantsev, A.N. Chernov, **A.G. Mukhamedzhanova** et al. // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – Vol. 10 (12). – PP. 3438-3441.**

*– статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ;

**– статьи в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.