

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:

Чернов Альберт Николаевич,

доктор биологических наук

Казань – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Современная эпизоотическая ситуация по бешенству в мире и Российской Федерации	10
1.2 Морфологическая характеристика вируса бешенства	13
1.3 Методы лабораторной диагностики бешенства	18
1.3.1 Диагностические методы, основанные на индикации рабического антигена	19
1.3.2 Диагностические методы, основанные на выделении вируса бешенства	25
1.3.3 Диагностические методы, основанные на обнаружении генома вируса бешенства	27
1.3.4 Методы оценки эффективности оральной вакцинации против бешенства	28
1.4 Технологические аспекты получения антигена вируса бешенства	30
1.4.1 Методы очистки антигена вируса бешенства	30
1.4.2 Методы контроля степени очистки вируса	35
1.5 Заключение по обзору литературы	37
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1.1 Материалы исследования	39
2.1.2 Методы исследования	43
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
2.2.1 Разработка модифицированного способа получения антигена вируса бешенства	51
2.2.2 Получение антигена вируса бешенства методом трёхфазной экстракции	63
2.2.3 Разработка схем гипериммунизации лабораторных животных	

очищенным АГ ВБ	76
2.2.4 Получение высокоспецифичных ФИТЦ-иммуноглобулинов для экспресс-тест-систем на основе МФА	86
2.2.5 Оценка диагностической эффективности высокоочищенных антирабических иммуноглобулинов в «сэндвич»-ИФА	93
3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	103
СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	106
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	127
ПРИЛОЖЕНИЯ	130

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. 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 [26, 31]. Неблагополучная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация регистрируется более чем в 160 странах мира [108], причём в большинстве из них вирус бешенства персистирует в организме наиболее опасных резервуаров инфекции – более чем в 99% случаев трансмиссии вируса людям осуществляется собаками [20].

Согласно данным Глобального альянса по контролю бешенства (GARС, 1917), ежегодные расходы, связанные с различными аспектами борьбы против данной инфекции, составляют 8,6 млрд долларов США. Основной ущерб, наносимый данным заболеванием, складывается из убытков, связанных с гибелью животных и людей, затрат на профилактические и противоэпизоотические мероприятия, а также на диагностические средства [27]. Последние играют первостепенное значение при планировании и проведении противоэпизоотических мероприятий, а также назначении курса постэкспозиционной профилактики пострадавшим людям и животным. 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 ВБ [10].

Наиболее точными и чувствительными методами индикации антигена ВБ, получившими широкое распространение, являются иммуноферментный анализ (ИФА) и метод флуоресцирующих антител (МФА) [5, 34, 43, 124, 137, 169]. К главным достоинствам указанных методов относятся высокая чувствительность и специфичность, коррелирующие с результатами, полученными при проведении

других серологических тестов, а также широкое распространение оборудования, позволяющего автоматизировать процесс индикации антигенов [18].

Уровень чувствительности и специфичности тест-систем, производимых на их основе, определяется в первую очередь степенью очистки специфических компонентов – рабических антигенов и антирабических иммуноглобулинов. Возможность проведения потоковых исследований по индикации АГ ВБ 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.

Таким образом, актуальной задачей являются разработка и совершенствование существующих методов получения высокоочищенных антигенных и глобулиновых компонентов, позволяющих произвести качественную индикацию АГ ВБ в ветеринарных лабораториях разного уровня.

Степень разработанности проблемы. Методикам получения рабического антигена посвящены работы ряда зарубежных [106, 139, 220] и отечественных авторов [15, 44, 47, 57].

Классические технологии получения очищенных антигенных компонентов ВБ связаны с выделением гликопротеина – наиболее мощного иммуногена, играющего ведущую роль в прикреплении вирионов к клетке и определяющего типовую специфичность рабдовирuсов [7, 39, 51], что, в свою очередь, предполагает решение двух основных проблем: дезинтеграции вирусных частиц и очистки антигенных эпитопов от субвирусных компонентов. К основным методам, составляющим подобные технологии, относятся обработка вируссодержащего материала неионными детергентами, гель-фильтрационная хроматография, ультрацентрифугирование (в том числе в ступенчатых и линейных градиентах плотности) и диализ. Однако практикуемые в настоящее время алгоритмы выделения АГ ВБ при помощи классических биохимических методов имеют ряд существенных недостатков: содержание побочных полипептидных примесей при обработке химически активными веществами, что

повышает риск получения ложноположительных результатов, низкий выход продукта и техническая сложность отбора антигенных фракций при градиентной флотации ВБ. В связи с этим целесообразно было разработать комбинированные методики 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 исследований. 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.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При очистке цельновирioнного ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ) модифицированным методом ультрацентрифугирования с градиентным разделением и последующей гель-фильтрацией в конечном продукте

обнаруживаются 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 антигенной детерминанте 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.

Научная новизна. Впервые разработаны и апробированы в производственных условиях способы получения высокоочищенного АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ), характеризующегося наличием единственной полипептидной фракции молекулярной 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 работы. 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 (см. Приложение 1).

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.

Основной объём исследований проведён автором самостоятельно, отдельные этапы работы выполнены с участием сотрудников лаборатории. Консультативную и методическую помощь при выполнении работы оказывали д.б.н. Ефимова М. А. и к.б.н. Хаертынов К. С.

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.

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современная эпизоотическая ситуация по бешенству в мире и Российской Федерации

Бешенство (Rabies, Lyssa, Hydrophobia) является природно-очаговым зооантропонозным заболеванием вирусной этиологии, протекающим по типу острого инфекционного менингоэнцефалита и характеризующееся абсолютной летальностью [17, 56, 86, 103, 111, 156, 186].

В настоящее время растущее количество очагов рабической инфекции является одной из важнейших проблем как здравоохранения, так и ветеринарии. Его эпидемиолого-эпизоотическая значимость определяется абсолютной летальностью при условии проявления клинических признаков, повсеместным распространением, латентным инкубационным периодом и отсутствием средств специфического лечения [16]. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ/WHO), бешенство является десятой по значимости причиной смерти людей от инфекционных болезней и регистрируется более чем в 160 странах мира [23]. Заболевание широко распространено среди диких, домашних и сельскохозяйственных животных в тропических странах. Ежегодно от этого заболевания погибает более 55 тысяч человек и более 1 млн животных [55], причём основное число случаев приходится на страны Африки и Азии [44], где регистрируется преимущественно городской тип бешенства [45]. Ежегодно более 15 миллионов человек в мире получает постэкспозиционную профилактику [23]. Экономический ущерб мировой экономике от бешенства складывается из убытков, связанных с гибелью животных и людей, а также затрат на проведение ограничительных и профилактических мероприятий [27].

Сравнительным благополучием по бешенству характеризуются острова Кипр, Маврикий, Ямайка, западные острова Тихого океана, Австралия и Новая Зеландия. Продолжительным и стабильным благополучием по бешенству отличается Великобритания благодаря наиболее жёстким требованиям относительно профилактики особо опасных инфекций [16]. Также своевременное

и качественное проведение эпизоотических мероприятий и принятие превентивных мер обеспечивает стабильное благополучие таких стран, как Финляндия, Нидерланды, Франция, Бельгия, Люксембург и Швейцария; после реализации обширных кампаний по элиминации рабической инфекции значительно улучшилась эпизоотическая ситуация в Германии, Венгрии, Словакии и Польше, однако в большинстве стран Восточной Европы эпизоотический процесс развивается по сей день. В последние годы участились случаи заболевания бешенством человека во Вьетнаме, Филиппинах, Лаосе, Индонезии, Китае [16].

Подавляющее число зарегистрированных в мире случаев заболевания обусловлено классическим бешенством. Оно не регистрируется на территориях Японии, Новой Зеландии, на Гавайях, а также в Австралии и Антарктике [77]. Цепи передачи других лиссавирусов более ограничены географически и кругом хозяев и чаще всего выделяются от летучих мышей.

Крайне напряжённая эпизоотическая ситуация по бешенству наблюдается в последние два десятилетия на территориях Российской Федерации, Украины, Беларуси, Хорватии и Литвы [16]. При этом количество заболеваемости велико не только среди диких, но и среди домашних животных. Согласно официальной статистике, в Российской Федерации за медицинской помощью в связи с нападением животных ежегодно обращается от 250 до 450 тыс. человек [44]. Согласно официальным данным, абсолютное большинство пострадавших подвергается постэкспозиционной профилактической вакцинации, и около 40 тыс. из них получают дополнительное лечение антирабическим иммуноглобулином. Несмотря на принимаемые меры, в России среди людей ежегодно регистрируется от 4 до 22 случаев клинического бешенства.

В настоящее время в России и странах СНГ эпизоотический процесс по бешенству определяется как эпизоотия смешанного или природно-очагового типа [33]. Являясь трансграничным заболеванием, бешенство способно распространяться как на региональном, так и на глобальном уровнях. До 80-х годов XX века число лиц, ежегодно обращавшихся за экстренной антирабической

профилактикой, не превышало 200 тысяч, а количество летальных случаев в период с 1971 по 2000 годы имело выраженную тенденцию к снижению [55]. В период с 1995 по 2014 годы ярко проявилась тенденция непрерывного подъёма эпизоотии с расширением нозоареала, причём наибольшее количество неблагополучных очагов было зарегистрировано в центральной части европейской России, в Поволжье, на Урале, в Южном и Северо-Кавказском регионах. Согласно данным Ассоциации практикующих ветеринарных врачей (2016), эти регионы по сей день являются зонами наибольшей степени риска инфицирования человека и животных, так как на них приходится более 85% всех случаев заболевания животных бешенством. Также была выявлена определённая тенденция повсеместного распространения нозоареала инфекции от вышеуказанных территорий в северном и северо-восточном направлении. Количество неблагополучных по бешенству территорий в период с 2000 по 2006 год увеличилось на 7,5%, при этом плотность инфекции повысилась в 1,44 раза. Общая напряжённость эпизоотической ситуации в России возросла почти в полтора раза [4]. Подобная ситуация связана с тем, что в результате тяжёлой экономической ситуации, сложившейся в стране в начале 1990-х годов, проводимые противозооотические мероприятия не возымели должного эффекта ввиду прекращения действенного контроля за плотностью популяций диких хищников, роста численности безнадзорных собак и кошек, недостаточного охвата территорий средствами специфической профилактики и недостатками существующих диагностических средств [55]. Текущая ситуация усугубляется ростом численности безнадзорных животных, повсеместным нарушением правил содержания домашних животных, резким сокращением исследований биоматериалов от диких животных. Стихийное развитие инфекционного процесса привело к тому, что к 2015 году нозоареал бешенства стал охватывать большую часть регионов страны.

Основной рост показателей неблагополучия в России по заболеваемости бешенством обеспечивают дикие и домашние плотоядные животные, заболеваемость сельскохозяйственных животных играет в инфекционном

процессе значительно меньшую роль [41]. В природных очагах главным резервуаром вируса бешенства являются дикие хищники семейства псовых: лисица, волк, енотовидная собака, корсак, в тундровой зоне – песец, в антропоургических очагах эпизоотии поддерживаются собаками и кошками. Около 83% выявляемых у диких животных случаев бешенства приходятся на лисиц [41], однако эпизоотологическая значимость бешенства волков имеет также отчётливую тенденцию к возрастанию. В связи с широкой и интенсивной циркуляцией рабического вируса в наиболее неблагополучных регионах страны в эпизоотические цепи все чаще вовлекаются дикие животные других семейств. За последние годы были зарегистрированы случаи бешенства у барсуков, хорьков, куниц, рысей, диких кошек, крыс, лосей, бобров, домашних мышей [16]. Выявлены случаи заболевания среди белок, хомяков, ондатр, нутрий и медведей. Главную роль в динамике распространения бешенства диких плотоядных (прежде всего, лисиц) играют сезонные изменения их активности, способные приближать места обитания лисиц к границам населённых пунктов, животноводческих ферм, пастбищ скота [29]. Процесс распространения бешенства является циклическим и развивается по закономерностям природных эпизоотий с тем лишь исключением, что ввиду абсолютной летальности заболевания животные, являющиеся инфицирующим звеном, всегда выбывают из цепи передачи инфекции.

Таким образом, подобной эпизоотической ситуацией по бешенству обусловлена высокая потребность отечественной биологической промышленности не только в антирабических вакцинах, но и средств диагностики, и вопрос их доступности, эффективности и чистоты остаётся для современной рабиологии одним из самых актуальных.

1.2 Морфологическая характеристика вируса бешенства

Заболевание бешенством у млекопитающих вызвано содержащим одноцепочечную РНК вирусом бешенства RABV, принадлежащим к роду *Lyssaviruses* семейства *Rhabdoviridae*, относящегося к порядку *Mononegavirales* V группы по Д. Балтимору [69]. Род *Lyssaviruses* включает в себя 7 основных

классифицированных и 4 неклассифицированных генотипа. К 1-му генотипу относятся лиссавирусы классического бешенства, обозначенные как вирусы уличного («дикого») бешенства, выделенные от наземных млекопитающих и кровососущих летучих мышей, а также фиксированные (вакцинные) штаммы вируса бешенства. 2-й генотип включает вирусы Lagos bat - LBV, выделенные от летучих мышей и плотоядных в Центральной и Южной Африке [198]; 3-й генотип – вирус Mokoia (MOKV), выделенный от землероек и плотоядных в Центральной и Южной Африке [174]. 4-й генотип – вирус Duvenhage (DUVV) выделен от летучих мышей в Южной Африке и Зимбабве; представители 5-го и 6-го генотипов – лиссавирусы 1-го и 2-го типов европейских рукокрылых EBLV-1 и EBLV-2, циркулируют на территории Европы, в том числе – в европейской части Российской Федерации [118, 191], 7-й генотип представляет собой эмерджентный вирус австралийских рукокрылых (ABLV), выделенный от заражённых людей. Также предполагается существование 5 новых генотипов: к 8-му и 9-му генотипу относят вирусы, выделенные в Центральной Азии – Khujand (KHUV) и Aravan (ARAV); к 10-му – вирус Irkut (IRKV), циркулирующий на территории Восточной Сибири, к 11-му – вирус Shimoni bat (SHIBV), обнаруженный в Кении, к 12-му – вирус западно-кавказских летучих мышей (WCBV) [127, 128]. RABV является первым изученным и описанным из 14 выявленных вирусов рода *Lyssaviruses* [90].

Как типовой вид рода *Lyssavirus*, вирус бешенства обладает характерной пулевидной (цилиндрической) формой, присущей рабдовирусам позвоночных [109], однако имеются сведения о существовании нетипичных (бацилловидных) форм вирионов [38]. Средняя длина полноценного вириона вируса бешенства составляет 130-300 нм, диаметр – 60-80 нм. Сердцевина вириона диаметром 45-50 нм, будучи симметрично закрученной внутри нуклеокапсида, также имеет пулевидную форму [116] и покрыта двуслойной липидсодержащей оболочкой, включающей в себя внешние поверхностные гликопротеиновые структуры [89]. Молекулярная масса цельных вирионов составляет $300-1000 \times 10^6$ Да, коэффициент седиментации – 550-1000 S. Рабические вирионы содержат 3-4%

РНК, 64-67% белка, 20-26% липидов и 3-10% углеводов [38]. В системах *in vitro* и *in vivo* вирус бешенства обладает способностью к формированию двух типов частиц: зрелых полных вирионов – В (от англ. Bullet – «пуля») и дефектных интерферирующих частиц (ДИЧ) – Т (от англ. Trunk – «ствол») [77]. ДИЧ не обладают инфекционностью, имеют размер 60-80 нм и содержат лишь часть полноценного вирусного генома, и их размножение возможно только в присутствии полного вириона [155]. Интерференция с В-частицами, как правило, происходит на стадии репликации вирусной РНК [101].

Геном вируса бешенства представлен одноцепочечной РНК с молекулярной массой $3,5-4,6 \cdot 10^6$ Да, обладающей, как и у всех лиссавирусов, негативной полярностью и необходимой для синтеза мРНК РНК-зависимую РНК-полимеразу [152, 187]. Константа седиментации вирионной РНК составляет 40-45 S, плавучая плотность $1,59-1,66$ г/см³. РНК вируса бешенства кодирует 5 основных структурных белков: нуклеопротеин (N-белок), фосфопротеин (Р-белок), матриксный протеин (М-белок), гликопротеин (G-белок), РНК-зависимую РНК-полимеразу (L-белок) [50]. Первые два белка входят в состав вирусной оболочки, остальные формируют нуклеокапсид (рис. 1). Белки нуклеокапсида L и P также являются компонентами транскриптазы [183].

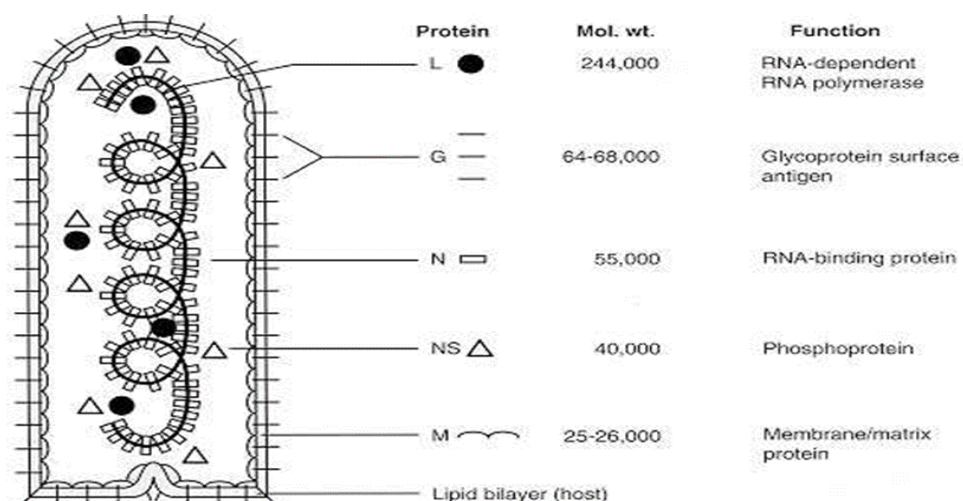


Рисунок 1 – Белки, кодирующие геном вируса бешенства (Leah Chandler, Rabies, 2008)

Нуклеопротеин (N-белок) – является доминирующим группоспецифическим антигеном [179], играющим основную роль в формировании клеточного иммунитета и отвечающим за выработку преципитирующих и комплементсвязывающих антител [64]. Антигенные N-детерминанты являются высококонсервативными среди различных вирусных изолятов и за счёт этого могут быть использованы в качестве мишеней для иммунохимической детекции рабической инфекции с применением специфических иммуноглобулинов [37]. Белок N связан непосредственно с РНК; одной из его функций является образование рибонуклеопротеина, обеспечивающего устойчивость РНК к клеточной РНК-азе [64].

С нуклеокапсидом связано еще два белка сердцевины: L (от англ. large — «большой») и NS (от англ. non structural — «неструктурный»), которые являются компонентами транскриптазы и в совокупности функционируют как полимеразы. Белок L (крупный нуклеокапсидный белок с массой 190 кДа) обеспечивает инициацию синтеза РНК, NS-белок (третий нуклеокапсидный белок с массой 40-50 кДа), ранее считавшийся неструктурным, — их элонгацию [38].

Гликопротеин (G-белок), входящий в состав суперкапсида, структурно представляет собой колбы диаметром 4,5-5,5 нм и длиной 2 нм. Качественный состав белковой части молекулы определяет вирулентность вируса. Его молекулярная масса составляет 65 кДа. G-белок играет определяющую роль в процессах адсорбции на поверхности чувствительных клеток [171], а также является протективным антигеном, индуцируя образование вируснейтрализующих антител, блокирующих вирусную адгезию. Также имеются сведения о его гемагглютинирующих свойствах [136].

Матриксный белок (M-белок) – негликозилированный мембранный белок с молекулярной массой 29 кДа – входит в состав внутреннего слоя суперкапсида вириона, связывая его с сердцевинной [144]. Его основными функциями являются объединение звеньев рибонуклеопротеина в цилиндр со спиральной симметрией, а также обеспечение протекания завершающей стадии морфогенеза вируса в инфицированной клетке [100].

Фосфопротеин (Р-белок), состоящий из 297 аминокислот [46], играет роль кофактора для L-полимеразы в процессах транскрипции и репликации вирусного генома посредством связывания с N- и L-белками через специфические области [76, 105]. Имеются сведения о том, что именно фосфопротеин обеспечивает аксонный транспорт вируса бешенства в центральную нервную систему [167], однако точный молекулярный механизм этого транспорта до сих пор не изучен. Также Р-белок способен выступать в роли антагониста интерферона, снижая таким образом иммунный ответ инфицированного животного [100, 172].

L-белок, являясь каталитическим компонентом полимеразного комплекса, отвечает за основную часть ферментативных реакций, участвующих в транскрипции вирусной РНК и репликации вирусного генома [147, 152]. L-белок инициирует инфекционный процесс путём запуска первичной транскрипции геномной РНК после попадания в цитоплазму инфицированной клетки [46].

Все изученные рабдовирусы имеют в своём составе по меньшей мере один белок N и два-три фосфопротеина [38], именно поэтому наибольшее диагностическое значение приписывается именно нуклеопротеину ввиду его роли в процессе вирусной репликации. Несмотря на то, что препаративно наработанные рабические нуклеопротеины не индуцируют образование вируснейтрализующих антител, они участвуют в образовании защитного иммунитета [47]. Согласно некоторым данным, иммунная защита может быть достигнута иммунизацией животных только нуклеопротеином вируса [107]. Более того, в настоящее время весьма актуален вопрос наработки иммуноглобулинов, специфичных к нуклеопротеину, для диагностических целей. В частности, имеются сведения о разработке иммуноферментной тест-системы, основанной на индикации нуклеопротеина и рибонуклеопротеина в антирабических вакцинах [124].

Морфологические свойства отдельных белковых структур вируса бешенства необходимо учитывать при разработке и усовершенствовании диагностических средств, основанных на индикации рабического антигена [96, 131, 170, 179].

1.3 Методы лабораторной диагностики бешенства

На сегодняшний день первичная диагностика бешенства основывается на комплексе клинико-эпизоотологических данных [35], однако выставление окончательного диагноза возможно исключительно на основании результатов лабораторной диагностики [46]. Диагностика на основании клинических признаков является недостоверной, так как клиника бешенства не имеет патогномичных проявлений и должна быть дифференцирована от столбняка, энцефалитов, энцефаломиелитов, болезни Ауески, ботулизма и других инфекций, характеризующихся нейродегенеративной симптоматикой. Диагноз на бешенство выставляется при получении положительного результата хотя бы по одному из методов лабораторной диагностики [10].

История становления лабораторной диагностики бешенства насчитывает более двух веков – в 1804 г. Г. Г. Цинке доказал инфекционную природу заболевания путём инъекции слюны заражённой бешенством собаки здоровым животным [162]. Дальнейшие исследования биологических свойств возбудителя бешенства, послужившие фундаментом для развития мировой рабиологии, были проведены Л. Пастером [112]; описываемые им техники послужили основой для традиционных методов диагностики бешенства.

На сегодняшний день залогом успешности планирования и проведения противозооотических мероприятий, а также формирования политики долгосрочного контроля бешенства является, помимо выставления клинического диагноза, своевременная индикация лиссавируса методами лабораторной диагностики [70]. Для этой цели применяются прямые методы, направленные на обнаружение антигена вируса бешенства, вирусных нуклеиновых кислот или следов их репликации в тканях, и косвенные, основанные преимущественно на серологических реакциях [140]. В Российской Федерации при лабораторной диагностике бешенства исследуют, как правило, аутопсийный материал с применением метода флуоресцирующих антител (МФА); в случае отрицательного или сомнительного результата МФА прибегают к дополнительной диагностике [11]. Представленные методы диагностики включают как рутинные тесты,

рекомендуемые WHO (*Laboratory Techniques in Rabies, 1996*) [148] и OIE (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2012*) для проведения потоковых исследований, так и более современные, эффективность которых доказана в эпидемиологических и филогенетических исследованиях.

1.3.1 Диагностические методы, основанные на индикации рабического антигена

Световая микроскопия (гистологическая идентификация вирусных включений) впервые была применена в 1887 г. В. Бабешем и независимо от него в 1903 г. – А. Негри [126]. Метод заключается в обнаружении характерных дегенеративных изменений и интрацитоплазматических включений, визуализируемых в мазках-отпечатках в окраске по Селлерсу [189], (альтернативно – по Муромцеву [16], Манну и Гимзе [19] в виде округлых образований с базофильными гранулами, розеткообразно расположенными внутри эозинофильного матрикса [140]. Несмотря на простоту выполнения и экспрессность, метод характеризуется низкой чувствительностью, составляющей, по данным разных авторов, от 40% [52] до 65-85% [99] и зависящей от длительности инкубационного периода и свойств штамма вируса бешенства, а также не подходит для исследования несвежего материала, что требует подтверждения диагноза другими тестами [10].

Метод флуоресцирующих антител (МФА; Fluorescent antibody test (FAT), разработанный Goldwasser и Kissling в 1957 г. [140], считается «золотым стандартом» в диагностике бешенства [87] и рекомендован OIE и WHO. В Российской Федерации МФА является одним из основных диагностических тестов и регламентирован действующим ГОСТом 26075-2013 «Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства». Метод заключается в визуализации нуклеопротеина N рабического антигена специфическими антителами с флуоресцирующими маркерами в полях зрения люминесцентного микроскопа. Результаты микроскопической оценки описываются в «крестах» (от одного + до четырёх ++++), выражающих субъективную градацию интенсивности

протекания реакции с точки зрения исследователя; в автоматизированных модификациях результат учитывается высокочувствительными флуоресцентными фотокамерами, что повышает точность сигнала и даёт значение относительного уровня флуоресценции в широком диапазоне шкалы, а также позволяет интерпретировать значения при помощи специализированных программ для анализа цитометрических данных. Различают непрямой метод (нМФА), подразумевающий двухфазную реакцию – с неконъюгированной иммунной сывороткой и с конъюгированным антивидовым белком, и прямой (пМФА), при котором применяют нанесение на исследуемый препарат либо суспензию клеток раствор прямо меченых флуоресцентным красителем антител [93]. Последний вариант получил наибольшее применение ввиду минимизации неспецифических реакций и отсутствия необходимости множества контролей, что позволило адаптировать его для автоматизированных методик. Порог чувствительности МФА составляет 3,8 lg LD50/мл, полученные результаты совпадают с таковыми при проведении биологической пробы до 98,7%, а время постановки реакции составляет 4-6 часов [52]. В отечественной и зарубежной литературе имеются сведения о применении МФА для прижизненной диагностики бешенства в эпителиальных клетках роговицы (корнеальная проба) и в кожных биоптатах [72], однако корнеальная проба не рекомендована для рутинной диагностики из-за риска скарификации роговицы, особенно при дифференциальной диагностике от энцефалита [200].

Повышение результативности МФА возможно за счёт использования моноклональных антител (МКА) к нуклеопротеину вируса бешенства [8].

Основным недостатком МФА считается непригодность для исследования консервированного материала ввиду риска получения ложноположительных результатов [10]: допускается исследование материала, консервированного в 50% растворе глицерина, при условии промывки нормальным изотоническим раствором, либо консервированного в формалине – после обработки протеолитическим ферментом [194]. К недостаткам МФА относится потребность в приобретении дорогостоящего люминесцентного микроскопа, а также

квалифицированного персонала для обслуживания оборудования и интерпретации результатов, что значительно ограничивает применение МФА в развивающихся странах, однако данный метод по-прежнему является одним из наиболее перспективных ввиду его дополнения комбинированными модификациями высокоинформативной микроскопии.

Иммуноферментный анализ (ИФА; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) – иммунологический метод, основанный на обнаружении комплекса антиген-антитело при помощи ферментативной метки (пероксидазы хрена). Существенными преимуществами анализа являются уникальная специфичность иммунохимической реакции, высокая чувствительность детекции ферментативной метки, стабильность реагентов, возможность создания каскадных систем усиления химического сигнала, а также простота автоматизации и дешевизна оборудования, что делает ИФА оптимальным методом для потоковой диагностики либо мониторинговых исследований [71, 195]. Так как процесс образования иммунохимических комплексов происходит в количественном соотношении, обусловленном аффинностью, концентрациями компонентов и условиями проведения реакции, количественная оценка образования комплексов является достаточной для определения исходной концентрации аналита. Порог чувствительности ИФА составляет $3,3 \lg LD50/мл$, время анализа – 5-6 часов [52].

Наиболее широко применимым в настоящее время является гетерогенный ИФА в микропланшетном формате, получивший распространение в тест-системах для клинических лабораторных исследований. В качестве твёрдой фазы используется поверхность лунок полистиролового планшета, на которые иммобилизован один из компонентов реакции, называемый в данном случае иммуносорбентом [80]. В ходе реакции комплексы оказываются фиксированными, а незадействованные субстанции удаляются в ходе многократных отмывок. В прямом варианте ИФА (пИФА) инкубируется антиген, количество которого определяется при помощи антител, меченых пероксидазой хрена [133]. В непрямом ИФА (нИФА) используют антитела к выявляемому антигену, соединённые со специфической меткой, которая и служит субстратом

ферментативной реакции [134]. По типу взаимодействия на стадии связывания аналита различают конкурентный и неконкурентный ИФА, наиболее подходящим для конструирования тест-систем среди которых является «сэндвич»-ИФА – разновидность непрямого неконкурентного гетерогенного анализа, в котором в качестве иммуносорбента выступает антитело. На стадии выявления специфического иммунокомплекса антиген оказывается соединён с молекулами иммобилизованных и меченых антител [59]. По аналогичному принципу работают тест-системы в антительном варианте, однако сорбентом в них является антиген. Основным преимуществом «сэндвич»-ИФА перед конкурентным методом являются большая чувствительность и возможность использования антигена меньшей степени очистки [10].

В последние годы получили распространение ИФА-тест-системы с использованием моноклональных антител; особенностью такой реакции является отдаление ферментативной реакции от стенки планшета, что делает тест-систему аналитически более чувствительной [60, 150].

Таким образом, ввиду своей экспрессности, экономичности, простоты постановки и возможности использования в полевых условиях ИФА является перспективным диагностическим методом, наиболее подходящим для конструирования тест-систем.

Реакция диффузной преципитации в агаровом геле (РДП) – основана на диффузии в агаровом геле растворимого рабического антигена и специфических антител с последующим образованием комплекса антиген-антитело, осаждаемого на месте образования в толще геля в виде полосы преципитации [10, 121]. Метод применим для исследования несвежего материала (за исключением консервированного глицерином и формалином), контаминированного бактериальной флорой, однако, согласно некоторым авторам [34], его чувствительность составляет 45-70%, тогда как минимальная пороговая концентрация вирусного антигена составляет $4,5 \lg LD_{50}$ [9]. Более того, получение отрицательного результата в РДП не исключает необходимости

дополнительной диагностики. Этими характеристиками метода обусловлена его низкая распространённость в лабораторной практике.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА) – метод выявления рабических антигенов или антител, основанный на агглютинации частиц латекса диаметром 0,8-1 мкм, сенсibilизированных антителами или антигенами [32]. Метод долгое время не находил широкого применения в ветеринарии и медицине, однако возрастающая тенденция к использованию в качестве носителей антигенов и антител инертных синтетических материалов привела к углубленному изучению возможностей применения РЛА и конструирования диагностикумов на её основе. Преимущество РЛА заключается в простоте и экспрессности постановки (время проявления реакции составляет 3-8 мин) и отсутствии перекрёстно реагирующих антигенов, что обеспечивает её высокие по сравнению с другими методами чувствительность и специфичность, достигающих 95,4% и 100% соответственно [138]. По своим диагностическим качествам РЛА превосходит иммунодиффузные тесты, РДП и встречный иммуноэлектрофорез и может конкурировать с ИФА. Ещё одним преимуществом РЛА, позволяющим проводить витальную диагностику, является широкий спектр анализов: имеются данные по разработке модификации РЛА для обнаружения антител в слюне [123]; специфичность и чувствительность теста относительно РИФ на мазках-отпечатках головного мозга составила 99% и 95% соответственно. К недостаткам РЛА относится достаточно высокий процент ложноположительных результатов [32], однако современные технологии синтеза латексов и внедрение новых материалов позволяют существенно снизить вероятность неспецифических реакций. На сегодняшний день тест-системы на основе РЛА активно используются в лабораторной практике, что делает метод достаточно перспективным в условиях скудной инструментальной оснащённости.

Иммунохроматографический анализ (ИХА) – иммунохимический метод анализа, основанный на принципе тонкослойной хроматографии, проводимый на тест-полосках, панелях или тест-кассетах и применяемый для неприборного одноэтапного качественного выявления рибонуклеопротеина вируса бешенства в

тканях головного мозга подозреваемых в заболевании животных [91, 130, 157, 177]. Принцип действия ИХА заключается в миграции анализата и антител с красителем. Если анализат содержит искомым антиген, то происходит его связывание и накопление антител с красителем вокруг вторых антител, жёстко иммобилизованных в тестовой зоне, что и даёт визуальную реакцию. Несвязавшиеся антитела с красителем мигрируют вдоль полоски и взаимодействуют с третьими антителами в контрольной зоне, что проявляется в виде окрашенной полоски. Метка в контрольной зоне при корректном проведении анализа должна проявляться вне зависимости от наличия антигена в анализате [157].

Имеются сведения о применении ИХА со вторичными специфическими МКА, мечеными коллоидным золотом, что позволяет визуализировать образовавшийся антиген-антительный комплекс в виде окрашенной линии [62]. Преимуществом ИХА являются получение результата в течение 10-20 минут и отсутствие необходимости проведения пробоподготовки, что делает его методом первого выбора для клинического использования. Чувствительность и специфичность метода достигают 91,7% и 100% соответственно, точность – 94,1% [180]. К недостаткам метода относится варьирование дифференциации и интенсивности оптического сигнала в зависимости от пороговой концентрации содержащегося в анализате антигена и определённый процент ложноотрицательных результатов [95].

Иммуногистохимический анализ (ИГХА) – метод, применяемый для определения как клеточных, так и тканевых антигенов с единовременным иммунологическим анализом тканей или клеток, осуществляемый с сохранением их морфологической структуры [184]. Выполнение данного метода предполагает использование стандартных гистологических техник, включающих парафинизацию мозговой ткани и приготовление гистосрезов в целях более качественной интерпретации анатомической локализации вирусного антигена. Индикация антигена основана на формировании иммунного комплекса в жидкой фазе путём соединения суспензии антигенного материала с антителами,

мечеными флуоресцирующим красителем. В настоящее время ИГХА в диагностике бешенства применяется крайне редко ввиду трудоёмкости, необходимости использования дорогостоящего оборудования и реактивов, в том числе токсичных, что делает невозможным широкое применение этого метода [164].

1.3.2 Диагностические методы, основанные на выделении вируса бешенства

Биологическая проба на лабораторных животных заключается в выделении вируса от больных, убитых или павших животных путём инокуляции патологического материала белым мышам и последующей его идентификацией [104]. Метод был разработан в 1935 г. L. T. Webster [196, 197] и по сей день является одним из самых надёжных при постановке диагноза и выделении вируса [53]. Биопроба считается положительной при выявлении в мазках-отпечатках мозга заражённых мышей телец Бабеша-Негри или при выявлении рабического антигена в МФА. Обладая 100% специфичностью, биопроба, тем не менее, является трудоёмкой, неэкономичной, требует виварных условий и квалификации персонала ввиду потенциального риска выноса возбудителя и подразумевает продолжительное наблюдение за подопытными животными (до 30 суток) [52]. Также имеется риск получения ложноотрицательных результатов – для их исключения рекомендуется осуществлять подбор животных, наиболее чувствительных к различным штаммам вируса бешенства.

Выделение вируса бешенства в культуре клеток. Первые сведения о чувствительности культур клеток, в частности, нейробластомы мыши (клона N 18), к вирусу уличного бешенства появились в 1978 г. (Smith A. L. et al), что послужило толчком для изучения способов культивирования вируса на тканевых системах [82, 122, 147, 173, 176, 186]. Внедрение данной группы методов в вирусологическую практику позволило получать высокоочищенные иммуногены. Доказана чувствительность к вирусу бешенства перевиваемых культур клеток, таких как Nil-2 (сублиния клеток хомячка) [66], CER (клетки куриных эмбрионов)

[75], MRC-5 (клетки лёгкого человека) [135], HEL (клетки эмбриона человека) [115], также установлена перспективность использования перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) для выделения уличного вируса бешенства с его последующей идентификацией в МФА [52, 53]. Время анализа с момента заражения культуры составляет 2-3 суток; результат оценивают по интенсивности цитопатогенного действия и по наличию округлых желтовато-зелёных светящихся гранул (в МФА).

Вирусовыделение в культурах клеток является достаточно трудоёмким методом. Сложности культивирования связаны с тем, что клетки внутренних органов, как правило, не представляют оптимальной среды для облигатных нейротропных вирусов, поэтому при их внесении в культуру клеток первичного накопления практически не наблюдается, а также с долгосрочной адаптацией фиксированных штаммов – для её ускорения применяют методы чередующихся пассажей, диализных пробирок и смеси клеток либо добавление поликатионов, что позволяет сохранять инфицированные клетки в течение долгого времени. Согласно данным Чернышовой Е. В. (2018), в последующем штаммы, адаптированные к одной культуре клеток, могут быть реплицированы в других клеточных системах.

Одним из методов идентификации выделенного вируса, как и для определения титра антител у иммунизированных животных [145], является реакция нейтрализации (РН) – универсальная вирусологическая реакция, основанная на способности специфических иммунных сывороток подавлять инфекционное действие вируса при смешивании с вирусосодержащим материалом [102]. О результатах РН судят по гибели чувствительных животных, заражённых смесью вирусосодержащего материала и сыворотки, либо по развитию клинической картины заболевания; в культурах клеток – по цитопатогенному действию. РН применяется для дифференциации бешенства от болезни Ауески, столбняка и бульбарной формы ботулизма и характеризуется 100% специфичностью. Однако РН является достаточно трудоёмкой, продолжительной по времени и неэкономичной [13]

1.3.3 Диагностические методы, основанные на обнаружении генома вируса бешенства

Генно-молекулярные методы являются достаточно трудоёмкими в постановке, требуют значительного оснащения оборудованием, высокой квалификации персонала, отличаются длительностью получения результатов и сложностью их интерпретации. В рамках рекомендаций ВОЗ данная группа методов играет второстепенную роль, однако нижеприведённые реакции незаменимы при необходимости дифференциации различных штаммов вируса бешенства и установлении их биологических свойств.

Дот-гибридизация (дот-блот) – метод, основанный на индикации и идентификации вирусной РНК с использованием специфических ДНК-зондов, представляющих собой меченые фаги, несущие вставки, комплементарные различным генам вакцинного штамма вируса бешенства (штамм PV), или рекомбинантные плазмиды. Как правило, аналиты наносятся на нитроцеллюлозную или PVDF-мембрану; при этом отсутствует стадия предварительного электрофореза в полиакриламидном геле, характерная для вестерн-блота [97]. Подобная гибридизация применяется для ретроспективной диагностики в тех случаях, когда выявление специфического антигена либо выделение вируса на культурах клеток или лабораторных животных невозможны [10]. По некоторым данным, чувствительность дот-блота относительно МФА составляет 98,4% для образцов головного мозга и 83,3% – для образцов слюны, тогда как специфичность достигает 100% [97].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Одним из наиболее распространённых вариантов ПЦР для диагностики бешенства является ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией), представляющий собой метод амплификации специфического фрагмента вирусной РНК. Время постановки диагноза методом ОТ-ПЦР исчисляется 5-6 часами, а в течение 16 часов при условии автоматического секвенирования возможно получение характеристик изолятов [10, 67, 73, 85]. В большинстве случаев ПЦР применяется для штаммовой дифференциации вируса бешенства [99]. Отмечается высокая чувствительность

реакции, составляющая 1-10 LD₅₀/мл; также имеются сведения о пригодности ОТ-ПЦР для индикации вирусной РНК в слюне, ликворе [79] и биоптате слюнной железы инфицированных животных и людей [151]. Тем не менее, метод ОТ-ПЦР не рекомендован ВОЗ для рутинной диагностики вследствие высокой контаминации образцами нуклеиновых кислот и высокой вероятности получения ложноположительных результатов. ПЦР и её разновидности являются эффективным средством инфекционного контроля лишь в том случае, если необходимо исследование разнообразного диагностического материала в короткий промежуток времени [21].

ДНК-микрочипы (DNA-microarray) – одна из новейших технологий в диагностике вирусных заболеваний, принцип действия которой заключается в ковалентной сшивке твёрдого носителя и множества одноцепочечных ДНК-зондов, имеющих определённую нуклеотидную последовательность и место на микрочипе [74]. В основе работы ДНК-микрочипов лежит явление гибридизации. одновременного анализа множества образцов. Высокая эффективность и специфичность получаемых с их помощью результатов обусловлена наноразмерной длиной контрольных олигонуклеотидов [81]. На сегодняшний день биочипы применяют для диагностики ограниченного количества инфекционных болезней, но предпринимаются попытки адаптировать данную технологию для индикации различных лиссавирусов [59, 83], что в перспективе может существенно повлиять на развитие экспресс-методов диагностики бешенства.

1.3.4 Методы оценки эффективности оральной вакцинации против бешенства

Одной из ключевых мер по ликвидации бешенства, эффективность которой определяется диагностическим подходом, является оральная вакцинация животных [9, 13, 14, 25, 42, 52]. Эффективность оральной вакцинопрофилактики подтверждается успешным зарубежным опытом: по данным ряда авторов, за последние годы ситуация по бешенству в Западной и Центральной Европе

значительно улучшилась [163] вплоть до тотальной элиминации рабической эпизоотии даже в условиях роста популяций плотоядных [12]. Подобный эффект был достигнут благодаря внедрению научно обоснованного комплекса превентивных мер, ведущее место в котором занимала оральная вакцинация.

В связи с тем, что в последние два десятилетия в Российской Федерации наблюдается интенсификация охвата территорий оральной вакцинацией [28], весьма актуальным является вопрос усовершенствования существующих диагностических методов.

Основными принципами оральной вакцинации являются долговременность, широкомасштабность, научно обоснованное планирование и последующий мониторинг её эффективности [9, 14]. Масштабность оральной вакцинации подразумевает своевременное обширное проведение мониторинговых мероприятий как неотъемлемой части стратегии [45, 46]. Комплекс диагностических мер включает в себя исследование сывороток крови на наличие антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) методами ИФА, RFFIT [114] и FAVN (Fluorescent antibody virus neutralisation test) [146], а также индикацию биомаркеров, входящих в состав вакцины. В Российской Федерации с целью отслеживания миграции иммунизированных животных применяются преимущественно вакцины, содержащие антибиотики тетрациклинового ряда, которые обладают способностью накапливаться в зубной ткани и костной ткани челюстей иммунизированных животных [45, 46] и являются долгосрочными метками. Данное свойство тетрациклина легло в основу косвенного критерия оценки поедаемости вакцины – определение скоплений тетрациклина по визуализации флуоресцирующих линий в срезах костной и зубной ткани (дентине и цементе) целевых животных, отстрелянных в зонах вакцинации, характерных жёлто-зелёных полуколец в полях зрения люминесцентного микроскопа [25, 65]. Погрешность при подсчёте тетрациклиновых линий в пробах зубной ткани может быть связана с тем, что с возрастом способность дентина к накоплению тетрациклинов значительно снижается, что ведёт к нечёткой визуализации их следов [46]. Так как определение уровней ВНА не может в полной мере

характеризовать эффективность вакцинации в виду их постепенного снижения, выводы о контакте животных с оральными вакцинами делают преимущественно по их тетрациклин-положительному статусу.

В качестве стандарта защитного уровня ВНА у животных принято значение 0,5 МЕ/мл; основным показателем при расчёте эффективности оральной вакцинации является доля животных, обладающих данным протективным уровнем.

Одной из причин неудовлетворительных результатов профилактических мероприятий по бешенству является гиподиагностика данного заболевания в региональных масштабах. В связи с тем, что основным диагностическим критерием при определении напряжённости иммунитета является определение уровня ВНА, усовершенствование диагностических экспресс-тест-систем на основе ИФА является первостепенной задачей для повышения эффективности проведения профилактических и мониторинговых кампаний.

1.4 Технологические аспекты получения высокоочищенных антигенов вируса бешенства

1.4.1 Методы очистки и концентрирования вируса бешенства

В ходе разработки новых и совершенствования существующих экспресс-тест-систем для лабораторной диагностики бешенства особое значение уделяется степени очистки вирусного антигена, так как он, являясь одним из ключевых специфических компонентов, определяет чувствительность и специфичность системы [15].

Методы отделения рабдовирусов, как и прочих вирусов, от клеточных элементов основаны на более высокой плавучей плотности вирусных частиц, связанных с содержанием в них нуклеиновых кислот. Технология получения высокоочищенного антигена вируса бешенства связана непосредственно с выделением гликопротеида, играющего ведущую роль в прикреплении вирионов к клетке и определяющего типовую специфичность рабдовирусов [1, 40].

Гликопротеид является наиболее эффективным иммуногеном, индуцирующим образование вируснейтрализующих антител (ВНА), что позволяет рассматривать его в качестве сырья для производства диагностического антигенного компонента, преимуществом которого является отсутствие балластных компонентов, вторичных белков, способствующих проявлению неспецифических реакций [57].

Рабдовирусы млекопитающих размножаются в мозговой ткани лабораторных животных после интрацеребрального заражения и могут быть выделены из природного материала после определённого количества пассажирований; несколько большая чувствительность метода достигается на мышатах-сосунах [2]. Средняя длительность пассажа рабдовирусов составляет 7-18 суток и более, учитывая особенности медленно репродуцирующегося вируса бешенства. Обнаружение вируса осуществляется посредством МФА; данный метод позволяет также осуществить дифференциацию нормальных инфекционных вирионов от ДИЧ [77].

Существующие способы получения очищенных гликопротеидов вируса бешенства связаны с осуществлением двух последовательных технологических процессов: дезинтеграции вирусных частиц и отделения гликопротеидов от субвирусных компонентов.

Дезинтеграция вирусных частиц представляет собой процесс распада вириона на составные части, происходящий под воздействием физических факторов, осуществляемый, как правило, с использованием детергентов – поверхностных амфифильных соединений, молекулы которых содержат гидрофильные и гидрофобные участки [57]. В отечественных и зарубежных источниках имеется множество сведений о методах и количестве детергентов, позволяющих произвести очистку некоторых ортомиксовирусов, герпесвирусов и рабдовирусов [166, 202]. Наиболее предпочтительным выбором для проведения дезинтеграции рабдовирусов являются неионные детергенты – они достаточно мягки по действию и большинство белков, как связанных с мембранами, так и свободных, выдерживают их значительные концентрации. К данному классу

веществ относятся Triton X-100 (ПЭГ-(9-10)-p-t-октилфенол) [98], имеющее в составе гидрофобный и гидрофильный фрагменты, что позволяет производить обработку без солюбилизации липидного компонента и выхода в раствор внутренних вирусных белков [57] и обеспечивает высокую степень чистоты препарата, а также додецилсульфат натрия (SDS) [143, 190].

Низкоскоростное центрифугирование является первичным этапом очистки вирусного материала и проводится, как правило, в режиме 10-40 мин при 3000-5000 g [22, 181] и имеет своей целью отделение неразрушенных клеток, клеточных ядер и фрагментов оболочек с осадком, тогда как надосадочная жидкость подвергается дальнейшей очистке. Более того, различия в коэффициентах седиментации ДИЧ (150-420 S) и стандартных вирионов (600 S) делают низкоскоростное центрифугирование пригодным для их частичного разделения [183]. На этом этапе концентрирование вирусов не происходит, т.к. часть вируса адсорбируется на удаляемых частицах, поэтому осадок рекомендуется подвергнуть промывке и повторному центрифугированию. Для ингибирования процесса адсорбции низкоскоростное центрифугирование рекомендуется проводить сразу после разрушения клеток.

Для достижения более высоких степеней очистки применяются дополнительные методы, основанные на поверхностных химических свойствах вирусов.

Осаждение в изоэлектрической точке (ИЭТ). Поскольку в состав наружной оболочки вирусов входят слабокислые белки, ИЭТ большинства вирусов лежит в области рН 3,5-6,0. Метод осаждения в изоэлектрической точке допустимо применять, доводя рН суспензии до нужной величины и отделяя преципитат вируса низкоскоростным центрифугированием. При этом вместе с вирусом будут осаждаться балластные белки, имеющие более высокую ИЭТ, чем вирус. Этот метод позволяет сконцентрировать вирус, т.к. последующее ресуспендирование осуществляется в значительно меньшем объеме; недостатком метода является повышенная чувствительность отдельных вирусов к изменениям

pH среды и возможная потеря биологической активности в результате разрушения вирионов [68, 153].

Осаждение сульфатом аммония является одним из классических биохимических методов. Процедура очистки и концентрирования вируса бешенства этим методом принципиально не отличается от аналогичного метода фракционирования белков [58, 168]. Одними из наиболее эффективных для осаждения солей являются цитраты, сульфаты и фосфаты, предпочтение среди которых отдаётся сульфатам ввиду их лучшей растворимости, хаотропных свойств и стабилизирующего эффекта, оказываемого ими на большинство белков в концентрациях выше 0,5 М. Механизм преципитации белков сульфатом аммония заключается в том, что сульфат-ионы понижают растворимость белковой молекулы, делая её более компактной, либо за счёт связывания молекул воды [92, 161].

Требуемая для осаждения вируса концентрация сульфата аммония может быть выражена двумя способами: объемно-весовыми процентами соли либо процентом от насыщения [110, 160]. Метод весьма эффективен, как и предыдущий метод осаждения в ИЭТ, но имеет ряд недостатков, т. к. некоторые вирусы разрушаются в растворах с высокой ионной силой. При осаждении вируса из очень большого объема (литры и даже десятки литров) требуется большое количества соли (килограммы). После осаждения вируса сульфатом аммония проводят низкоскоростное центрифугирование, надосадочную жидкость сливают, а вирусный осадок суспендируют в небольшом количестве буферного раствора, содержащего ЭДТА. Следующей стадией очистки является диализ, при котором происходит удаление ионов соли и частичное освобождение от балластных веществ [117, 158, 193].

Зональное (скоростное) центрифугирование в градиенте плотности является одним из самых совершенных методов препаративной техники вирусологических исследований [155, 185]. Принцип метода состоит в том, что компоненты смеси, различающиеся по скорости седиментации, перемещаются под действием центробежной силы в центрифужной пробирке через непрерывный

градиент концентрации [141]. С целью приготовления градиентов концентрации чаще всего применяют сахарозу [185]. Градиент концентрации сахарозы препятствует конвекции и стабилизирует зоны частиц.

Очистка вирусов в линейном градиенте плотности сахарозы позволяет отделить нормальные инфекционные частицы от ДИЧ, при этом в результате последующего диализа значительная часть вирусных частиц разрушается, снижая инфекционность седиментированного вируса в конечном препарате в 2-3 раза [2]. Плавающая плотность рабических вирионов в сахарозе составляет 1,17–1,19 г/см³, константа седиментации составляет 600–625 S [38, 155]. В целях очистки концентрированную суспензию вируса бешенства наслаивают на пологий (5-30%) или крутой (10-60%) линейный градиент плотности сахарозы и центрифугируют в течение 45-60 минут при 55 000 – 60 000 g. После центрифугирования отбирают фракции градиента (при наличии визуальных зон разделения – согласно зонированию), собранный вирус ресуспендируют в 3-5 объёмах трис-НСI буфера, осадок отбирают для дальнейшего биохимического анализа. Для снижения лабильности инфекционных свойств сконцентрированного вируса рекомендуется внести белок-носитель, в частности, для этих целей применяется бычий сывороточный альбумин (БСА) [185].

Разделение в ступенчатом градиенте плотности хлористого цезия (CsCl) является альтернативой разделению в градиенте сахарозы и характеризуется рядом достоинств – более высокой степенью очистки, меньшей зависимостью от температурных условий, однако требует дорогостоящего оборудования для ультрацентрифугирования [61, 139]. Технологически процесс воспроизводится аналогично таковому с использованием сахарозы; плавающая плотность вирионов в хлористом цезии составляет 1,19—1,20 г/см³. Имеются сведения о разработке оптимизированного способа разделения вируса бешенства в ступенчатом градиенте плотности хлористого цезия с использованием режима общего центрифугирования [154], позволяющего сохранить антигенную активность конечного препарата, что позволит в дальнейшем существенно сократить затраты на ультрацентрифугирование.

Метод хроматографической очистки вируса бешенства зарекомендовал себя как один из наиболее эффективных и высокоразрешающих. Принцип метода основан на распределении веществ между неподвижной (твёрдой) фазой и подвижной (элюент), что позволяет добиться перемещения отдельных компонентов пробы согласно константам распределения. Современные модификации данного метода позволяют минимизировать риск повреждения вирионов, а также избавиться от клеточной ДНК, что обусловлено оптимальным выбором сорбентов. Одним из способов, исключающих деградацию рабических вирионов, является ионообменная хроматография с применением гелей, содержащих диэтиламиноэтиловый (ДЭАЭ) радикал, например, ДЭАЭ-сефарозного геля, применимого в трисовых или фосфатных буферных системах. Элюат наносится непосредственно на хроматографическую колонку; вирусная суспензия, полученная путём элюирования с колонки, как правило, имеет степень чистоты, сопоставимую со стандартами, применимыми в отношении вирусов в производстве иммунобиологических препаратов. [165, 188].

1.4.2 Методы оценки степени очистки вируса бешенства

На стадии оценки чистоты антигенных препаратов наиболее распространёнными методами являются электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблот, позволяющие охарактеризовать белковый профиль выделенного антигена.

Электрофорез в ПААГ (PAGE) является одним из классических биохимических методов, основанных на движении заряженных макромолекул в постоянном электрическом поле, разделение которых достигается за счёт различий заряда, молекулярных масс и конфигураций молекул [36]. Существует большое количество модификаций электрофореза белков; наиболее распространённой разновидностью является электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по Лэммли [89, 129, 203]. В данной модификации перед нанесением на гель антигенные образцы подвергаются кипячению в присутствии SDS и 2-меркаптоэтанола, в результате чего происходит

восстановление дисульфидных связей и снижение подвижности денатурированных полипептидов. В данных условиях все полипептиды приобретают равный удельный заряд и разделяются обратно пропорционально логарифму их молекулярной массы. Денатурирующий электрофорез в ПААГ проводится в различных буферных системах; по умолчанию метод подразумевает использование буферной системы Лэммли, но имеются сведения о применении таких буферов, как трис-НСl, трис-трицин, Tris/Borate/EDTA (ТВЕ), ТВЕ с мочевиной. Наиболее оптимальным для изучения белкового профиля вируса бешенства является disc-электрофорез («разрывной») с использованием геля, состоящего, в свою очередь, из концентрирующего (рН 6,8, концентрация ПААГ – 2–8%) и разделяющего (рН 8,5–9, концентрация ПААГ – 5–20%) гелей. Подобная система позволяет производить концентрирование белков на границе двух гелей, что значительно повышает разрешающую способность метода. Для визуализации продуктов разделения применяют окрашивание белков раствором Кумасси либо коллоидного серебра. В большинстве случаев интерпретация результатов проводится посредством визуальной оценки гелей, однако возможна автоматизация процесса с применением денситометров либо программного обеспечения, позволяющего провести оцифровку гелей и определить такие параметры, как электрофоретическая подвижность препарата, его чистота, оптическая плотность белкового пятна. Определение молекулярной массы белка производится путём калибровки геля относительно молекулярных масс белков-маркеров [47]. SDS-PAGE по Лэммли является достаточно чувствительным методом; так, в интервале 10–20 кДа возможно разделение белков, отличающихся на 0,1 кДа, что эквивалентно одному аминокислотному остатку [36].

Белковый иммуноблот (вестерн-блоттинг) является высокочувствительным аналитическим методом, используемым для определения в образце специфичных белков [54, 192]. Антигены, предварительно подвергнутые электрофорезу, переносятся на нитроцеллюлозную или поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану и далее детектируются с использованием антирабических иммуноглобулинов. Исключение

ложноположительных результатов при проведении вестерн-блоттинга обусловлено блокированием неспецифических связываний, основанным на прикреплении иммуноглобулинов исключительно на сайтах связывания специфических целевых белков. Детекция результатов обычно проводится колориметрическим методом, основанным на инкубации вестерн-блота с субстратом, который реагирует с репортерным ферментом (пероксидазой хрена). При этом растворимый краситель переходит в нерастворимую форму другого цвета, окрашивая мембрану. Количество белка определяется денситометрически или спектрометрически [178], однако возможна и флюоресцентная детекция фотосенсорами, производимая на цифровом снимке блота, что позволяет произвести количественный вестерн-блот-анализ [94].

Таким образом, подобный подход к оценке белковых профилей выделяемых антигенов на каждой стадии технологического процесса позволяет контролировать последовательность операций с целью повышения чистоты конечного продукта.

1.5 Заключение по обзору литературы

Бешенство является одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний, сложность элиминации которого в глобальных масштабах обусловлена механизмом передачи вируса, спецификой патогенеза, скоростью распространения эпизоотии и отсутствием средств специфического лечения. Изыскания мирового рабиологического сообщества направлены главным образом на совершенствование существующих средств диагностики бешенства. Доступные на данный момент диагностические методы представлены либо серологическими методами, либо основаны на индикации рабического антигена либо вирусных нуклеиновых кислот в исследуемых тканях. Согласно анализу представленных в обзоре методов по критериям трудоёмкости, требований к квалификации персонала, экономической эффективности, точности, чувствительности и специфичности наиболее подходящими для рутинной потоковой диагностики бешенства, в том числе в рамках эпизоотического

мониторинга, представляются ИФА и МФА. Для реализации данных методов в формате диагностических экспресс-тест-систем необходима их комплектация высокоспецифичными компонентами – рабическими антигенами и иммуноглобулинами.

Специфичность антигенных компонентов определяется прежде всего степенью их очистки. На сегодняшний день в биологической промышленности успешно применяется ряд классических биохимических и биотехнологических методов, позволяющих добиться препаративного выделения отдельных белковых компонентов, выступающих в качестве иммуногенов. Особый интерес представляет разработка и внедрение оптимальной схемы очистки антигена для получения высокоактивных фракций, лишённых гетерологичных примесей и вторичных белков. Выделение подобных антигенных фракций в перспективе позволит не только получить высококачественное сырьё для диагностических компонентов, но и использовать их в качестве иммуногена для получения высокоспецифичных иммуноглобулинов. Подбор методик и разработка технологической схемы для получения искомых препаратов должны базироваться на знаниях биологических свойств вируса бешенства.

Разработки в данном направлении помогут в дальнейшем обеспечить лабораторную практику усовершенствованными тест-системами, что, в свою очередь, способно повысить эффективность мероприятий по борьбе с бешенством.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

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). Отдельные этапы исследований проводились при активном участии д.б.н. Ефимовой М. А., к.б.н. Хаертынова К. С., к.в.н. Ахмадеева Р. М., д.б.н. Сайтова В. Р.

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1.1. Материалы исследования

В экспериментальной работе использовались:

Фиксированные и эпизоотические штаммы вируса бешенства и болезни Ауески и вакцины:

- производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ – использовался для получения и наработки рабических антигенов и иммунизации лабораторных животных (цельный вирус или его антигены);

- фиксированный референтный штамм вируса бешенства CVS (Challenge virus strain) – использовался в качестве контрольного штамма в диагностических реакциях (ИФА, РИФ, РН);

- эпизоотический штамм вируса болезни Ауески «Арский» – использовался в качестве контрольного гетерологичного антигена в диагностических реакциях;

- вакцина против бешенства животных инактивированная «Nobivac Rabies», изготовленная из штамма Pasteur RIV («Intervet International B. V.»);

- вакцина антирабическая инактивированная жидкая культуральная «Рабиков», изготовленная из штамма «Щёлково-51» (ФКП «Щёлковский биокомбинат»);

- вакцина антирабическая культуральная инактивированная «Рабивак-Внуково-32» для иммунизации человека, изготовленная из штамма «Внуково-32» (АО «НПО «Микроген»).

Диагностические специфические препараты:

- конъюгат «Белок А», меченый пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich»);
- антитела диагностические против IgG сыворотки крови барана, меченые пероксидазой хрена (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи»);
- антитела диагностические козы к IgG сыворотки крови кролика, меченые пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich»);
- антирабический пероксидазный конъюгат (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Стандартные препараты:

- лиофилизированный рабический антиген, полученный из головного мозга овцы, инфицированной ВБ из штамма «Овечий» ГНКИ (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);
- лиофилизированный контрольный отрицательный антиген (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);
- флуоресцирующий антирабический глобулин (ФАГ) (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);
- контрольный флуоресцирующий глобулин (КФГ) (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);
- лиофилизированный антирабический глобулин (АнГ) (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);
- стандартный маркер молекулярных масс «Broad Range» (Bio-Rad) («Bio-Rad») с белками-калибрантами: миозин (200,0 кДа), β -галактозидаза (116,5 кДа), фосфорилаза В (97,4 кДа), сывороточный альбумин, (66,2 кДа), овальбумин (45,0 кДа), карбоангидраза (31,0 кДа), ингибитор трипсина (21,5 кДа), лизоцим (14,4 кДа), арготинин (6,5 кДа).

Лабораторные животные. Для культивирования ВБ использовались мыши (*Mus musculus*) инбредной линии BALB/c (n=350) массой 18-20 г. Для наработки вирусосодержащего материала использовались ягнята (*Ovis aries*) в возрасте 2

месяцев массой 15-17 кг (n=4). Для получения антирабических гипериммунных сывороток использовали клинически здоровых лабораторных животных: овец массой 45-50 кг (n=8), кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) массой 3,5-4 кг (n=25). Для постановки биопробы использовались белые беспородные мыши (n=100) массой 8-10 г и мышата-сосуны массой 3-5 г.

Пробы биологического материала. В рамках скрининговых исследований по индикации АГ ВБ 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).

Химические реактивы. При выполнении экспериментальных работ использовались химические реактивы фирм «Sigma-Aldrich», «Thermo Fisher Scientific», «Merck», «Panreac», «Appli-Chem», «Pharmacia», а также реактивы российского производства с маркировкой «ХЧ».

Приборы и оборудование. В работе использовали следующее основное оборудование: центрифуга высокоскоростная Centrifuge 5804 R с ротором S-4-104 («Eppendorf»); ультрацентрифуга Optima L-90K с ротором SW 41 Ti («Beckman Coulter»); центрифуга для микропробирок Centrifuge MiniSpin с ротором F-45-12-11 («Eppendorf»); гомогенизатор FastPrep-24 («MP Biomedicals»); камера для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad»); коллектор фракций FRAC-100 («Pharmacia LKB»); графопостроитель Recoder Rec-102 («Pharmacia LKB»); насос перистальтический Peristaltic Pump Varioprepex («Pharmacia LKB»); спектрофотометр UV5 («Mettler Toledo»); спектрофотометр Multiskan GO («Thermo Fisher Scientific»); хроматограф NGC Discover 100 («Bio-Rad»); колонки хроматографические для гель-фильтрации ENrich SEC 70 («Bio-Rad»); система гель-документирования Gel Doc XR+ («Bio-Rad»); микроскоп люминесцентный Eclipse E200 («Nikon»); диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т (ООО «Амторг»); термостат электрический суховоздушный ТС-1/20 СПУ (ООО «СпектроЛаб»); рН-метр «Эксперт-рН» базовый («Оптимум»); весы аналитические «ВЛ-124В» («ККМ»); центрифужные концентраторы VivaSpin

(«Sartorius»); дозаторы автоматические одноканальные и многоканальные («Ленпипет»).

Растворы, используемые в исследованиях:

0,01 М фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH=7,4±0,02. 10 г двузамещённого фосфорнокислого натрия, 1 г однозамещённого фосфорнокислого калия в 1 л дистиллированной воды;

0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), pH=9,5-9,7. 65 мл 0,2 М раствора карбоната натрия, 185 мл 0,2 М раствора гидрокарбоната натрия, до 1 л дистиллированной воды;

Фосфатно-солевой буферный раствор с твином (ФСР-Т). Использовался промышленный 25-кратный концентрат (ООО «Медико-биологический Союз»);

1,5 М трис-НСl буферный раствор, pH=8,8. 181,7 г трис-гидроксиметил-аминометана в 100 мл дистиллированной воды;

0,5 М трис-НСl буферный раствор, pH=6,8. 60,57 г трис-гидроксиметил-аминометана в 100 мл дистиллированной воды;

30% раствор акриламида. 29,2 г акриламида, 0,8 г метиленбисакриламида (сшивающий реагент) в 100 мл дистиллированной воды;

Лизирующая смесь для электрофореза. 3 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,5 М трис-НСl буферного раствора, 1,6 мл глицерола, 1,6 мл SDS, 0,4 мл β-меркаптоэтанола, 0,4 мл 0,5% бромфенолового синего;

Субстрат для иммуноблота при конъюгации с пероксидазой хрена. 15 мг 3,3'-диаминобензидина, 7,5 мг хлорнафтола в 30 мл PBS;

Субстрат для иммуноблота при конъюгации с щелочной фосфатазой. 10 мг NBT (нитротетразолевый голубой хлорид), 5 мг BCIP (5-бromo-4-хлоро-3-индолфосфатаза), 0,7 мл DMF (диметилформамид) в 30 мл дистиллированной воды.

2.1.2 Методы исследования

Культивирование (репродукция) вируса бешенства. Нарработку вирусного материала производили путём интрацеребральной или внутримышечной (в область верхней губы) инъекции суспензии вируса бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ в дозе 0,03 см³. В течение 3 суток после заражения отслеживались случаи неспецифической гибели. Для приготовления инфекционного материала ткань мозга павших мышей растирали в ступке с добавлением стерильного 0,86% изотонического раствора хлорида натрия до получения 10% суспензии. Суспензию осаждали в течение 10-15 минут при 3000 g. Супернатант сливали, к осадку добавляли антибиотики из расчёта 500 МЕ пенициллина и 3 мг стрептомицина на 1 см³. Осадок уничтожали путём автоклавирования. Заражение овец производили интрацеребрально путём перфорации лобных костей и инъекции вышеуказанного инфекционного материала в суммарном объёме 1,0 см³ (по 0,5 см³ на каждое полушарие). В качестве альтернативного способа инокуляции материала применяли также внутримышечные инъекции в область латеральных поверхностей массетеров. Заражённых овец в агональной стадии заболевания (в течение 5-6 суток после заражения) подвергали забою и стерильно извлекали головной мозг. Мозговую ткань подвергали механической гомогенизации, после чего готовили 20% суспензию на стерильном ФБР.

Очистка и концентрирование вируса бешенства.

Первичная обработка вирусосодержащего материала (ВСМ). В целях высвобождения вирусных частиц из клеточного материала полученную 20% мозговую суспензию, предварительно инактивированную 0,025% β-пропиолактона, подвергали гомогенизации на приборе FastPrep-24 в пробирках Blue Matrix трёхкратно в течение 20 с в присутствии однородных частиц карбида кремния. Осаждение клеточного дебриса производилось путём низкоскоростного центрифугирования (4000 g в течение 60 минут). Полученный супернатант подвергали ультрацентрифугированию (УЦФ) при 37000 g в течение 90 мин,

после чего вторичный супернатант сливали для дальнейшей очистки, а осадок ресуспендировали в 0,02 М трис-НСl буферном растворе. Обработку осадка, полученного после низкоскоростного центрифугирования, производили путём трёхкратного озвучивания на диспергаторе; длительность одного цикла составляла 40 с, интервал между циклами – 60 с.

Электронная микроскопия ВБ производилась методом негативного контрастирования (НК) на сетках с плёнкой-подложкой. На сетки наносили несколько капель ВСМ, выдерживали 2 мин и удаляли фильтровальной бумагой; после промывки дистиллированной водой в течение 30 с наносили каплю контрастирующего раствора (2% водный раствор уранилацетата) с экспозицией 20-50 с. Сетки просматривали в электронном микроскопе JEM 100 CX-II («Jeol», Япония), съёмку производили на фототехническую плёнку Agfa Orthochromatic. Для получения электронных фотографий негативы сканировали на сканере Perfection 4990 Photo («Epson», Япония) с разрешением 600 dpi. Морфометрическая и статистическая обработка микрофотографий производилась с помощью программ AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss) и ACDSee Pro 6.0.

Разделение ВСМ по плавающей плотности производилось в ступенчатом градиенте плотности сахарозы по модифицированной методике Dietzhold (1996). Градиент формировали путём последовательного наслаивания 10-60% растворов сахарозы с шагом 10% в дозе 2 мл на каждую концентрацию раствора. ВСМ наслаивали поверх градиента, после чего подвергали УЦФ при 30000 g в течение 240 минут. По окончании УЦФ из центрифужных пробирок отбирали 7-11 фракций, соответствующих зонам разделения градиента; отбор фракций производился вручную либо при помощи датчика Uvicord.

Осаждение антигенов производилось 96% этанолом, бутанолом-1, насыщенным раствором сульфата аммония в пропорциях 1:1, 2:1, 3:1, 4:1.

Гель-фильтрация антигенных фракций. Разделение сконцентрированного антигенного материала проводили посредством ионно-обменной хроматографией по заряду на хроматографической колонке (длина 40 см, диаметр 2,5 см), заполненной бисерным полимером диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ-

целлюлоза), уравновешенной 0,25 М трис-HCl буфером (pH=7,8). Пробы собирали на коллекторе фракций при спектрофотометрическом контроле. Документация результатов осуществлялась при скорости элюции 0,7 мл/мин.

Оценка иммунохимических свойств антигенных фракций. На каждом этапе технологического цикла производилась оценка чистоты, активности и специфичности промежуточных стадий флотации рабического антигена. Белковые профили фракций оценивались методами электрофореза и иммуноблоттинга, серологическая активность – методом ИИФА.

Аналитический disc-электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофоретическую активность антигенных фракций изучали по методу Лэммли в денатурирующих условиях в присутствии 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), а также в нативных условиях. Для создания разделения использовали 12,5% разделяющий и 4% концентрирующий ПААГ. Для ранжирования молекулярных масс использовали набор маркеров Broad Range («Bio-Rad»). Электрофорез производился при постоянном напряжении 210 В в течение 60-80 мин. В целях анализа белковых профилей полученные гели подвергали окрашиванию в четырёх модификациях.

Окрашивание по Кумасси. Приготовление красителя осуществлялось из расчёта 0,5% коллоидного раствора Кумасси на 3,5% хлорной кислоты с инкубацией в течение 24 часов с последующей фильтрацией через обеззоленный фильтр. Инкубация геля в красителе осуществлялась в течение 2 часов с периодической сменой раствора по мере потемнения и последующим погружением в фиксирующий раствор.

Окрашивание коллоидным серебром. Предварительно окрашенные по Кумасси гели инкубировали в 0,05% формалина в течение 30 мин при 60°C с последующей двукратной отмывкой дистиллированной водой. Приготовление красителя осуществлялось из расчёта 0,36% натрия гидроксида, 0,49% аммиака, 0,8% нитрата серебра (до обесцвечивания смеси). Гель инкубировали в красителе в течение 5-10 минут, визуально контролируя потемнение треков. Остановку

реакции производили стоп-реагентом из расчёта 10% тиосульфата натрия, 0,019% формальдегида, 0,005% лимонной кислоты.

Результаты электрофореза фиксировали на приборе Gel Doc XR+ (Bio-Rad) и обрабатывали с использованием программы Image Lab Software 6.0.

Иммуноблот (вестерн-блоттинг). Перенос гелей на нитроцеллюлозную мембрану (Supported nitrocellulose membrane, 0,45 μm , 30 cm x 3 cm roll, Bio-Rad) осуществляли по Towbin H. (1979) во влажном варианте. После просушивания мембраны инкубировали с гипериммунными кроличьими и овечьими сыворотками в течение 2 часов, со специфическими конъюгатами – в течение 1,5 часов. Учёт реакции производился в течение 15 минут после внесения субстратной смеси при трёхкратной отмывке ФСР-Т.

Иммуноферментный анализ. Постановку осуществляли в непрямом твердофазном варианте (НИФА). В качестве твёрдой фазы использовали 96-луночные полистироловые планшеты («Titertek»). Растировка антигенных фракций производилась с 1:10 до 1:40960. Сорбцию фракций на планшеты осуществляли в течение 20 часов при 4°C на КББ. Постановку реакции производили на ФБР-Т в общем объёме 100 мкл. В качестве положительного контроля вносили гипериммунные сыворотки кроликов (титр 1:6400) и овец (1:12800), иммунизированных вакцинами «Внуково-32» и «Nobivac» (коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). Инкубацию сывороток производили в течение 1,5 часов при +37°C. В качестве конъюгатов использовали антирабический пероксидазный конъюгат (производство ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») в разведении 1:3200, специфические антитела против барана, меченые пероксидазой хрена, в разведении 1:5000, кроличий антирабический конъюгат в разведении 1:50000. Инкубация проб с конъюгатом осуществлялась в течение 1 часа при 37°C. Отмывка планшета на каждом этапе производилась трёхкратно. Проявление реакции производилось путём внесения конъюгат-связывающего субстрата (из расчёта 400 мг ортофенилендиамина (ОФД) на 10 мл фосфатно-цитратного буфера (ФЦБ). Фиксация результатов производилась путём внесения в лунки стоп-реагента – 0,2 М серной кислоты. Инструментальный учёт результатов

реакции производился спектрофотометрически при длине волны 492 нм. За рабочее разведение антигенной фракции принимали такое её разведение, при котором коэффициент ингибирования ($K_{инг}$), составляющей отношение оптической плотности (ОП) к таковой в аналогичной лунке с отрицательным контролем, был равен или превышал значение 2,1.

Реакция иммунофлуоресценции. Постановку РИФ осуществляли по ГОСТу 26075-84. Мазки-отпечатки готовили на предметных стёклах, предварительно обезжиренных смесью Никифорова, из коры больших полушарий, продолговатого мозга, мозжечка и аммоновых рогов, а также из ресуспендированных антигенных фракций. Препараты фиксировали в ацетоне при -20°C в течение 30 минут. На высушенные препараты наносили ФАГ в разведении 1:8 в объёме $0,1\text{ см}^3$ и инкубировали во влажной камере при 37°C в течение 30 минут, после чего двукратно промывали ФБР. Для контроля специфичности комплекса «антиген-антитело» на отдельные препараты наносили КФГ в разведении 1:8 и инкубировали в аналогичных условиях. Промытые в дистиллированной воде и высушенные препараты подвергали люминесцентной микроскопии при увеличении 100х. О наличии антигена ВБ судили по выявлению в нейронах и вне клеток ярких зеленовато-жёлтых гранул размером до 15-20 мкм.

Учёт реакции производили общепринятым методом в крестах: «++++» – яркое, интенсивное жёлто-зелёное свечение; «+++» – отчётливо выраженное жёлто-зелёное свечение; «++» – неяркое жёлто-зелёное свечение; «+» – слабое свечение, обнаруживаемое в крупных включениях серо-зелёного цвета; «-» – отсутствие специфического свечения.

Иммунизация лабораторных животных. Гипериммунизация овец производилась путём последовательного четырёхкратного введения инактивированного антигена с интервалом 14 суток в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ, Incomplete Freund's adjuvant, «Thermo Fisher Scientific») внутримышечно в область медиальной поверхности бедра в суммарном объёме 16 см^3 . Основанием для забора крови служила активность сыворотки, показатели которой в НИФА должны быть не менее 1:6400. Забор

крови производился стандартным методом из ярёмной вены в объеме 250-300 мл от животного через месяц после заключительной иммунизации при достижении титров сыворотки 1:6400 – 1:12800 в НИФА.

Гипериммунизация кроликов производилась по методу Бали с некоторыми модификациями. Первую дозу иммунизирующего антигена в суммарном объёме 1 см³ вводили в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) в 10 точек по 0,1 см³ внутрикожно по обеим сторонам позвоночного столба. Вторую дозу антигена в суммарном объёме 1 см³ вводили через 6-8 недель подкожно в области плеч по 0,5 см³. Третью и последующие дозы антигена инъецировали по аналогии со второй с промежутками в 14 суток в зависимости от динамики антителогенеза.

Белковые профили полученных сывороток определяли методом стрипового вестерн-блота. Для электрофореза гелей, предназначенных для переноса, использовались антирабические вакцины, нанесённые на сплошную гребёнку.

Очистка и концентрирование антирабических иммуноглобулинов. Выделение γ -глобулиновой фракции проводили методом преципитации насыщенным раствором сульфата аммония, согласно ранее изложенной методике [9]. К охлажденной сыворотке крови при постоянном помешивании добавляли насыщенный раствор сульфата аммония из расчёта 50% конечного насыщения, промывкой образовавшегося преципитата 2,78 М раствором сульфата аммония, последующим растворением отмытого осадка и диализом против стартового буфера (0,025 М трис-НСl буфера, рН=7,8). Белковые профили фракций определяли методом аналитического электрофореза в 7% ПААГ по Лэммли с последующим окрашиванием коллоидным раствором Кумасси G-250. Оценка серологической активности и специфичности полученных иммуноглобулинов осуществлялась методом НИФА.

Мечение антирабических иммуноглобулинов ФИТЦ. Мечение иммуноглобулинов флуоресцеин-5-изотиоцианатом («Merck») производилось методом конъюгации из расчёта 0,05 мг красителя на 1 мг белка в течение 18 часов при +4°C в темноте. Последующее удаление несвязавшегося красителя достигалось гель-фильтрацией на колонках с использованием геля сефадекс G-25.

Полученные фракции были проанализированы спектрофотометрически при длинах волн 280 нм и 495 нм, что соответствует областям максимального поглощения для белка и ФИТЦ соответственно. Концентрацию меченого белка (K_6) и молярное соотношение ФИТЦ/белок ($K_{ф/б}$) на основе данных спектрального анализа рассчитывали по формулам [4]:

$$K_6 = (ОП_{280} - 0,32 \cdot ОП_{495}) : 1,4 \quad (1)$$

$$K_{ф/б} = 2,87 \cdot ОП_{495} / (ОП_{280} - 0,32 \cdot ОП_{495}) \quad (2), \text{ где:}$$

$ОП_{280}$ – значение оптической плотности при длине волны 280 нм;

$ОП_{495}$ – значение оптической плотности при длине волны 495 нм;

0,32, 1,4, 2,87 – расчётные коэффициенты.

Активность и специфичность меченых глобулиновых фракций определяли в РИФ по вышеизложенному алгоритму.

Индикация АГ ВБ в патологическом материале. Определение титров АГ ВБ в 10% суспензиях мозговой ткани на изотоническом растворе хлорида натрия осуществляли методом «сэндвич»-ИФА на полистироловых планшетах, предварительно сенсibilизированных антирабическими иммуноглобулинами.

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

Статистическая обработка данных. 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.

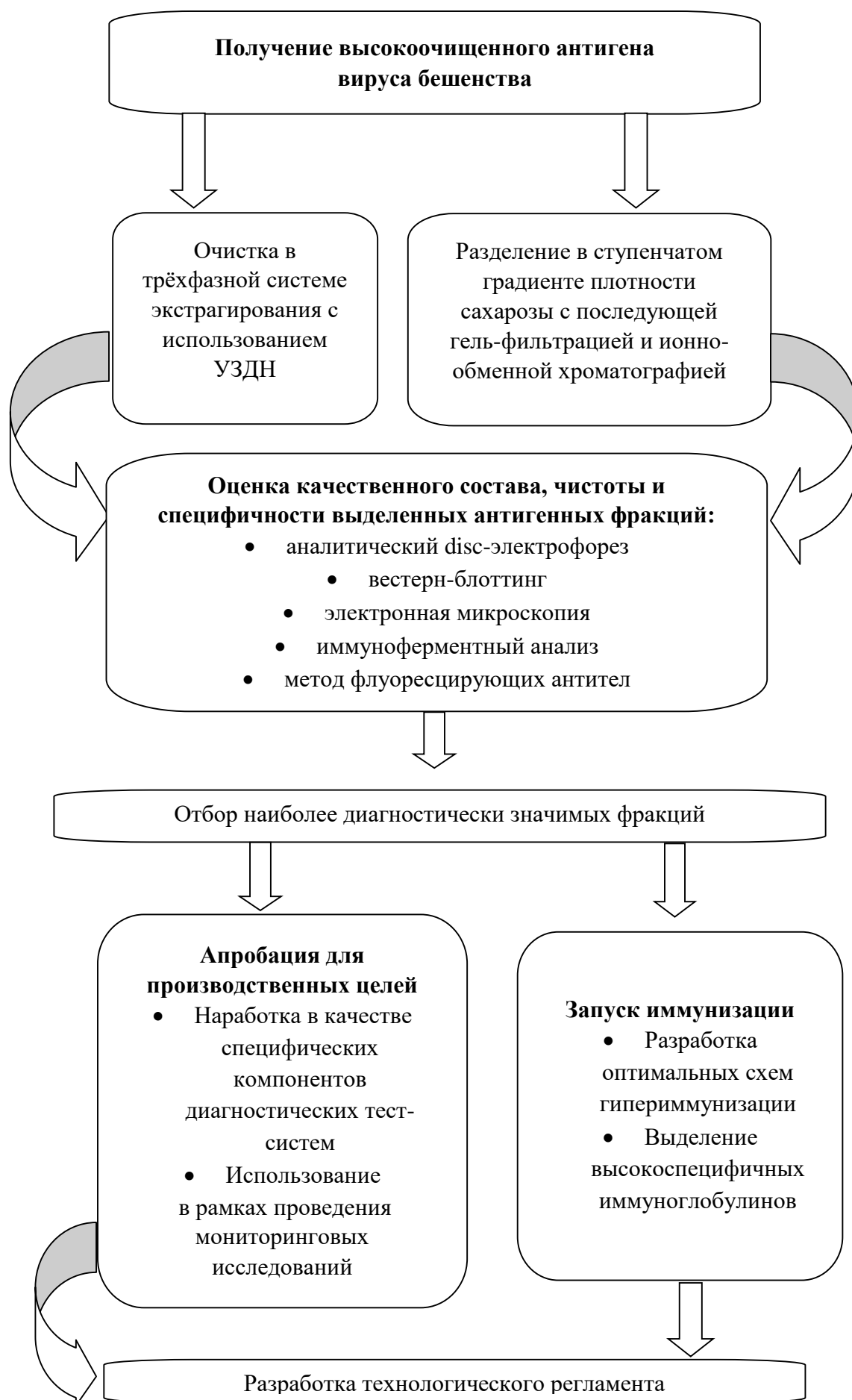


Рисунок 2 – Общая архитектура исследований

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Разработка модифицированного способа получения антигена вируса бешенства

Одним из основных компонентов экспресс-тест-систем для диагностики бешенства на основе ИФА и МФА является рабический антиген. От степени его очистки во многом зависит чувствительность и специфичность диагностических наборов. Основными требованиями, предъявляемыми к диагностическим антигенам, являются их способность к сорбции на поверхности носителя, гомогенность и высокая связываемость с твёрдой фазой, а также сохранение свойств при лиофилизации и длительном хранении.

Целью настоящей серии экспериментов явилась разработка способа выделения антигена производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ, основанного на дезинтеграции клеточной массы мозговой суспензии, ультрацентрифугировании, разделении в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и последующем удалении балластных белков при помощи гель-фильтрации обогащённого вирусосодержащего материала посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) среднего давления.

Первичная обработка ВСМ. Вирус бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ инфекционный титр 5,25 lg LD₅₀/0,03 мл) освежили через мозг 12-14-суточных мышат путём проведения 5-7 пассажей, стерильно извлекали мозг и готовили 10% суспензию на изотоническом растворе натрия хлорида. Полученной суспензией в дозе 1 см³ интрацеребрально заражали беспородных ягнят 2-3-месячного возраста, полученных от серонегативных овец. На 7-10 сутки после заражения при проявлении клинических признаков ягнят выводили из эксперимента посредством декапитации, после чего готовили 20% суспензию на 0,1 М ФБР и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в течение 3-5 минут. Дополнительную дезинтеграцию с целью более полного разрушения клеток головного мозга и высвобождения вирусных частиц осуществляли на приборе

Fast-Prep 24 (MP Biomedicals) в пробирках Blue Lysing Matrix B в следующем режиме обработки: скорость вибрации – 6 мл/с, время обработки – 30 секунд, количество повторов – 3, временной интервал между циклами обработки – 5 минут. Дезинтегрированную мозговую суспензию выдерживали в пробирках не менее 5 минут до полного осаждения шариков карбида кремния; супернатант отбирали в отдельную стерильную ёмкость. Разрушенную суспензию осаждали центрифугированием при 5000 g при температуре 8-10°C в течение 50 минут на центрифуге Eppendorf 5804 R. Супернатант и осадок отбирали в отдельные стерильные ёмкости. Отобранный супернатант концентрировали путём ультрацентрифугирования при 37000 g при температуре +4°C в течение 90 минут на ультрацентрифуге Optima L-90K (ротор SW-41).

Подобный алгоритм дезинтеграции и осаждения исходной мозговой суспензии позволил получить сравнительно гомогенный супернатант, освобождённый от клеточного дебриса, явившийся основным материалом для дальнейшего выделения антигена.

Разделение ВСМ по плавучей плотности в ступенчатом градиенте сахарозы. Разделение в градиенте плотности сахарозы при помощи УЦФ было выбрано нами, поскольку является эффективным методом, позволяющим разделять материалы, обладающие различной плотностью, и добиться максимальной возможной на этом этапе степени очистки ВСМ от вторичных белков.

После концентрирования вирусной массы путём УЦФ супернатант удаляли, осадки ресуспендировали в 0,5-1,0 см³ 0,02 М трис-НСl буфере и трижды встряхивали на Vortex V1 Plus с интервалами по 30 секунд. Ресуспендированный осадок наслаивали в объёме 0,7-0,9 см³ на преформированный ступенчатый градиент плотности сахарозы (10-60%) с шагом 10% на 0,02 М трис-НСl буфере и центрифугировали при 30000 g при температуре 4°C в течение 240 минут на ультрацентрифуге Optima L-90K (ротор SW-41).

На данном этапе в целях визуализации исследуемого материала и контроля присутствия в образцах вируса бешенства нами была проведена **электронная**

микроскопия методом негативного контрастирования осадка, полученного после ультрацентрифугирования. Результаты электронно-микроскопического исследования материала после первичного УЦФ представлены на рисунке 3.

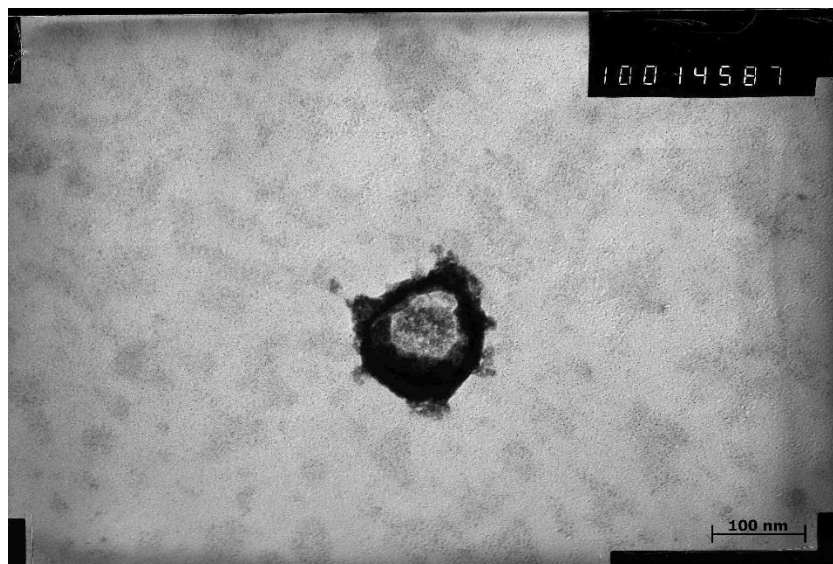


Рисунок 3 – Микрофотография вириона ВБ в материале, полученном после первичного УЦФ (НК). Риска = 100 нм

Характерная форма и размер объекта, представленного на микрофотографии, дают нам основания предположить, что он представляет собой дефектную интерферирующую частицу (ДИЧ) ВБ [115]. Наличие ДИЧ в испытуемом образце, в свою очередь, свидетельствует о присутствии в дезинтегрированном материале антигенных компонентов.

По окончании центрифугирования стенки центрифужных пробирок прокалывали и отбирали антигенсодержащие фракции, соответствующие визуальным зонам опалесценции, в отдельные пробирки (рисунок 4 А). Всего было получено 7 фракций, включая осадок (рисунок 4 Б).

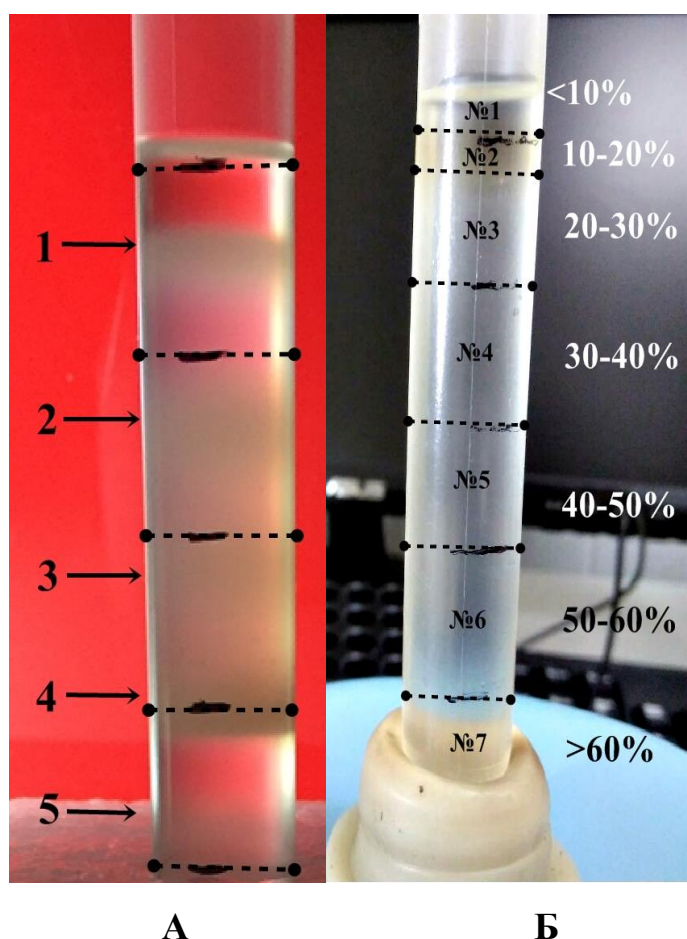


Рисунок 4 – Процесс разделения ВСМ в градиенте плотности сахарозы:
 А – распределение визуальных зон опалесценции (1-5);
 Б – схема отбора антигенных фракций.

Определение активности и специфичности выделенных фракций.

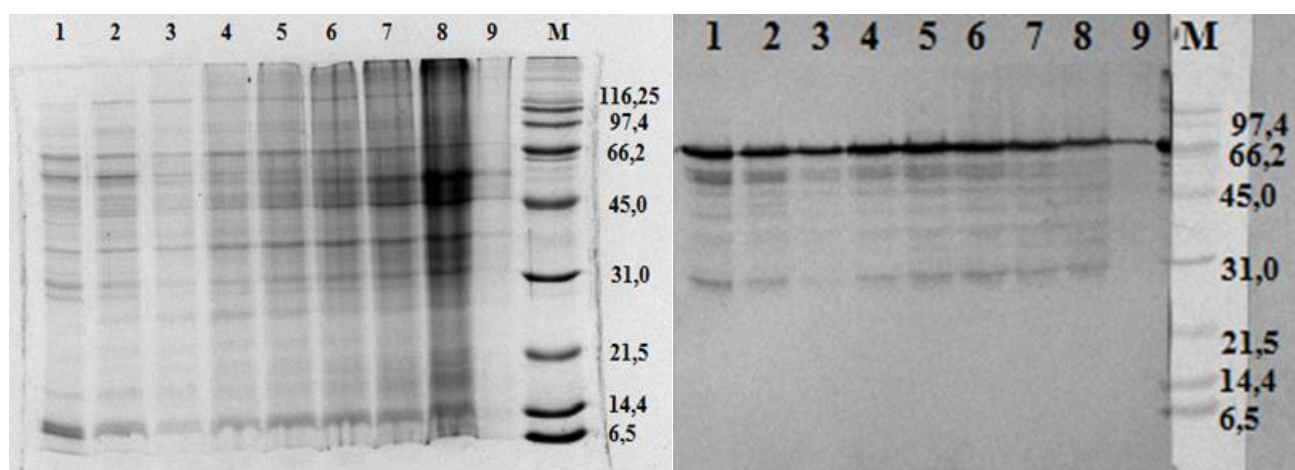
Следующим этапом исследования явилось определение характеристик выделенных фракций: содержание белка, активность и специфичность, диапазоны локализации мажорных полипептидов.

Согласно результатам измерений на фотометре UV-5 (Mettler Toledo) при длине волны 280 нм, содержание белка в ВСМ по мере очистки варьировало следующим образом (таблица 1):

Таблица 1 – Концентрации белка (C_6) в антигенных фракциях, полученных на различных стадиях фракционирования

Наименование пробы	C_6 , мг/мл
Исходная 20% мозговая суспензия	30,027±2,12
Супернатант после центрифугирования при 5000 g	11,667±0,29
Супернатант после УЦФ при 37000 g	0,535±0,08
Осадок после УЦФ при 37000 g	1,692±0,21
Фракция № 1 (до 10%)	1,284±0,54
Фракция № 2 (10-20%)	1,086±0,17
Фракция № 3 (20-30%)	0,914±0,032
Фракция № 4 (30-40%)	0,781±0,068
Фракция № 5 (40-50%)	0,307±0,045
Фракция № 6 (50-60%)	0,168±0,047
Фракция № 7 (осадочная)	0,257±0,023

Белковые профили вышеперечисленных фракций были исследованы методом аналитического disc-электрофореза в 12,5% ПААГ, серологическая активность – методом вестерн-блоттинга с использованием гипериммунной кроличьей сыворотки (титр в НИФА 1:6400) в разведении 1:100 (рисунок 5 А, Б).



А

Б

Рисунок 5 – Электрофореграмма, окрашивание по Кумасси (А) и вестерн-блоттинг на НЦМ (Б) 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 Broad Range («Bio-Rad»).

Представленные результаты вестерн-блоттинга свидетельствуют о значительной серологической активности разделённого по плавучей плотности фракция АГ, которая наблюдается практически во всех зонах визуальной опалесценции, кроме зоны 60% сахарозы. Наибольшая активность локализовалась на границе градиента сахарозы до 30% (фракция АГ № 3), что подтверждается денситограммой данного материала (рисунок б).

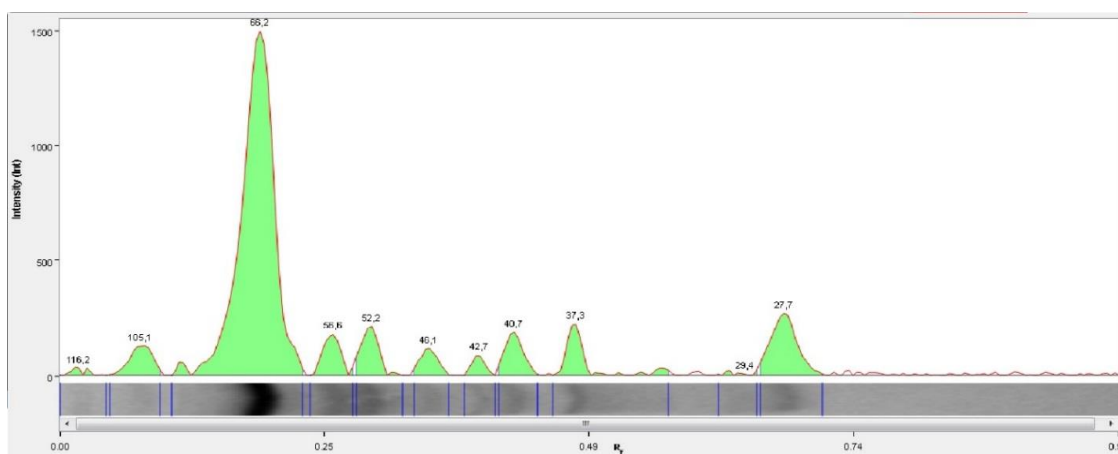


Рисунок б – Денситограмма с НЦМ фракции АГ № 3 (вирусного материала, отобранного с 20-30% зоны сахарозы)

Исходя из представленного белкового профиля, в данном материале обнаруживается одна мажорная полипептидная фракция молекулярной массой 66,2-67,0 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.

Для исследования в ИФА фракции АГ разводили в соотношении 1:20 на 0,1 М КББ, вносили в верхний ряд лунок полистиролового планшета для иммунологических реакций и проводили последовательное двукратное разведение материала на том же буфере по вертикали в разведениях 1:20 – 1:5120. Определение активности и специфичности иммобилизованного в лунках планшета материала проводили с использованием гипериммунной овечьей сыворотки (титр 1:12800) и сыворотки интактных овец в разведениях 1:100. Продолжительность сорбции фракций ВСМ составляла 20 часов при температуре 4°C, инкубации с сыворотками – 1,5 часа при температуре 37°C, со специфическим антивидовым конъюгатом – 1 час при температуре 37°C. Результаты активности исследуемых фракций представлены на рисунке 7.

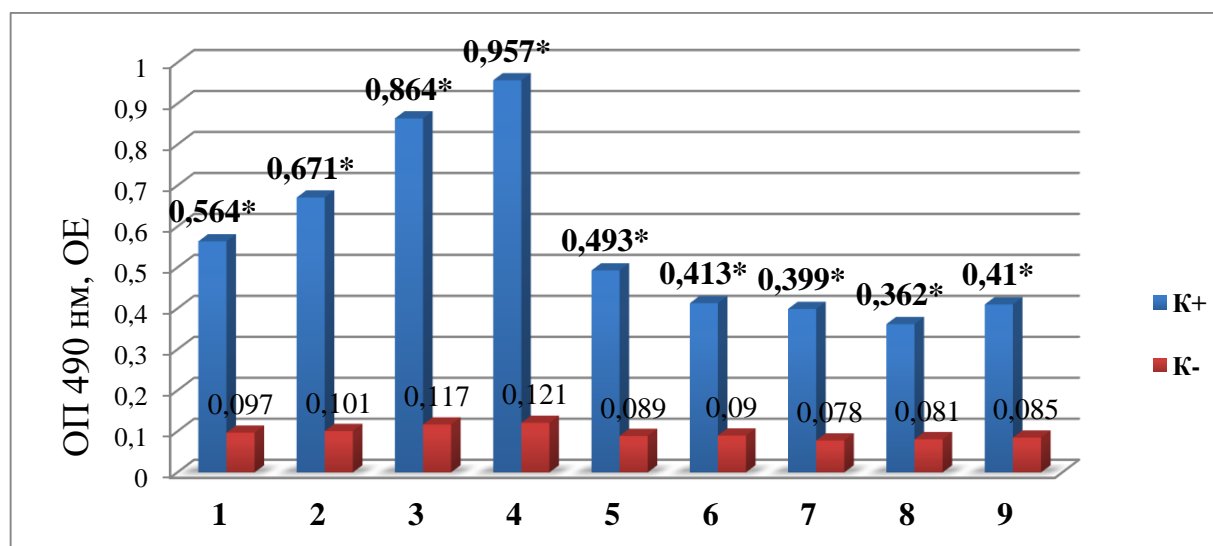


Рисунок 7 – Показатели ОП фракций антигена вируса бешенства в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в наименьшем разведении, OE ($K_{cp} \geq 2,1$): **1** – исходный ВСМ после УЦФ при 37000 g до разделения; **2** – фракция АГ № 1; **3** – фракция АГ № 2; **4** – фракция АГ № 3; **5** – фракция АГ № 4; **6** – фракция АГ № 5; **7** – фракция АГ № 6; **8** – фракция АГ № 7; **9** – дополнительная осадочная фракция.

Примечание: * – достоверно относительно показателей отрицательного контроля, $p < 0,001$.

Из графика распределения активности фракций АГ видно, что показатели сорбированного материала при инкубации с положительной сывороткой достоверно выше, чем таковые с отрицательной, что свидетельствует о наличии во всех исследуемых фракциях специфические для вируса бешенства антигены. Так, наибольшую активность проявила **рассмотренная нами выше фракция № 3**, отобранная с зоны сахарозы 20-30%. Её 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.

Хроматографическая очистка антигенных фракций. Полученный в результате градиентного разделения антигенсодержащий материал был отобран на основе результатов вестерн-блота и ИФА для дальнейшей хроматографической очистки методом гель-фильтрации на хроматографе NGC Discovery («Bio-Rad») с использованием колонки ENrich™ SEC 70. Контроль разделения осуществляли при помощи одноволнового УФ-детектора при длине волны 280 нм. Фракции отбирали в объёме 1 см³ при помощи коллектора фракций. В процессе хроматографической очистки с каждой зоны сахарозы были выделены отдельные фракции, наиболее диагностически значимые из которых были представлены материалом АГ № 3, отобранным с 20-30% зоны сахарозы.

Результаты фракционирования иллюстрированы рисунком 8.

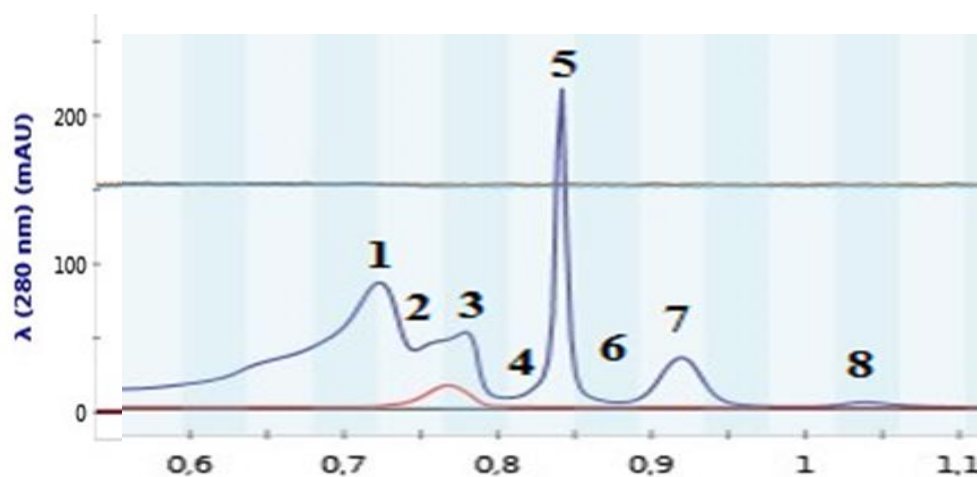


Рисунок 8 – Гистограмма фракционирования антигенсодержащего материала, отобранного по результатам вестерн-блоттинга после УЦФ в градиенте плотности сахарозы, полученного методом гель-фильтрации.*

Примечание: * – по оси абсцисс указано количество элюирующего буфера, прошедшего через колонку, по оси ординат – ОП при длине волны 280 нм, ОЕ.

По результатам фракционирования было отобрано 8 дополнительных антигенных фракций, включая осадочную. Их серологическая активность была происследована в реакции вестерн-блоттинга и ориентировочном ИФА на модели гипериммунных овечьих сывороток, полученных к нативному штамму ВБ «Овечий» ГНКИ (рисунок 9).

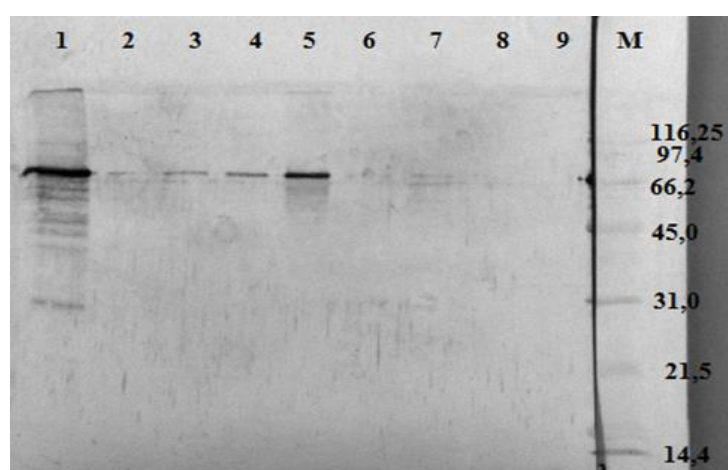


Рисунок 9. Вестерн-блоттинг на НЦМ после гель-фильтрации с гипериммунной кроличьей сывороткой. **Треки:** 1 – исходный вирусный материал до хроматографии (зона 20-30% сахарозы); 2 – фракция № 1; 3 – фракция № 2; 4 –

фракция № 3; **5** – фракция № 5; **6** – фракция № 6; **7** – фракция № 7; **8** – фракция № 8; **9** – пустой трек; **М** – маркер молекулярных масс Broad Range («Bio-Rad»).

Исходя из анализа денситограмм фракций, наибольший интерес относительно серологической активности и степени очистки представляет фракция № 5 (рисунок 10). Основная мажорная белковая фракция в ней соответствует молекулярной массе 64,9 кДа, также наблюдается одна минорная фракция молекулярной массой 50,0-55,1 кДа, что качественно соответствует белковому профилю исходного вирусного материала, однако в рассматриваемом препарате значительно снижена концентрация вторичных белков.

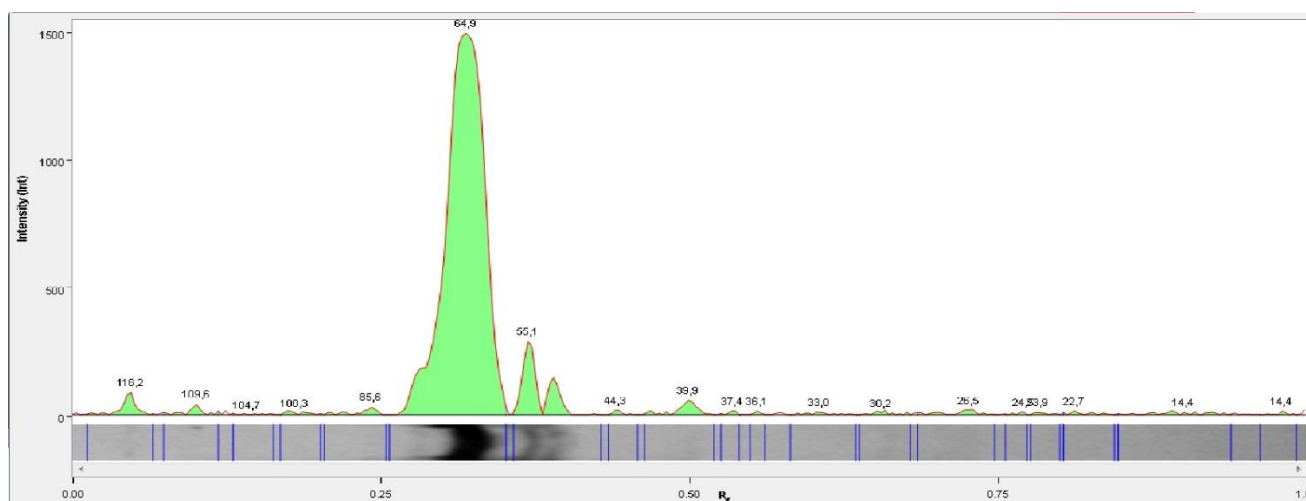


Рисунок 10 – Денситограмма вестерн-блота антигенной фракции № 5, полученной методом гель-фильтрации вирусного материала, отобранного с 20-30% зоны сахарозы

Постановку ИФА с антигенными фракциями, полученными методом гель-фильтрации, на модели гипериммунных овечьих сывороток производили в аналогичных условиях с титрацией проб от 1:20 до 1:20490. Критерием отбора очищенных фракций служил показатель оптической плотности, превышающий 0,5 ОЕ в рабочем разведении 1:2560. Результаты исследования активности и специфичности наиболее диагностически значимых фракций представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность и специфичность в ИФА антигенных фракций после разделения в градиенте сахарозы и очистки методом гель-фильтрации

АГ ВБ с зоны сахарозы	Антигенные фракции после гель-фильтрации	ОП ₄₉₀ в наименьшем разведении с положительными и отрицательными сыворотками, ОЕ
№ 1 (<10%)	АГ ВБ № 1/1	0,826±0,044 / 0,143±0,011
	АГ ВБ № 1/2	0,837±0,027 / 0,187±0,016
№ 2 (10-20%)	АГ ВБ № 2/1	0,577±0,034 / 0,087±0,009
	АГ ВБ № 2/2	0,788±0,036 / 0,113±0,012
	АГ ВБ № 2/3	0,566±0,021 / 0,095±0,009
№ 3 (20-30%)	АГ ВБ № 3/1	0,677±0,036 / 0,089±0,011
	АГ ВБ № 3/2	0,621±0,019 / 0,076±0,014
	АГ ВБ № 3/3	0,765±0,034 / 0,092±0,017
	АГ ВБ № 3/4	0,976±0,054 / 0,101±0,012
	АГ ВБ № 3/5	1,195±0,035 / 0,197±0,018
	АГ ВБ № 3/6	0,212±0,006 / 0,054±0,003
	АГ ВБ № 3/7	0,432±0,044 / 0,076±0,009
	АГ ВБ № 3/8	0,894±0,029 / 0,191±0,019
№ 4 (30-40%)	АГ ВБ № 4/1	0,549±0,031 / 0,108±0,006
	АГ ВБ № 4/2	0,726±0,041 / 0,126±0,008
№ 5 (40-50%)	АГ ВБ № 5/1	0,598±0,026 / 0,134±0,015
	АГ ВБ № 5/2	0,530±0,029 / 0,117±0,005
№ 7 (<60%)	АГ ВБ № 7/1	0,544±0,019 / 0,098±0,007

Исходя из данных таблицы, наибольшую серологическую активность, как и по результатам вестерн-блота, проявил материал, отобранный с 20-30% зоны сахарозы (рисунок 11). Показатель ОП в разведении 1:20 составил 1,195±0,035 ОЕ, что превысило таковой до хроматографической очистки в 1,21 раза ($p < 0,05$).

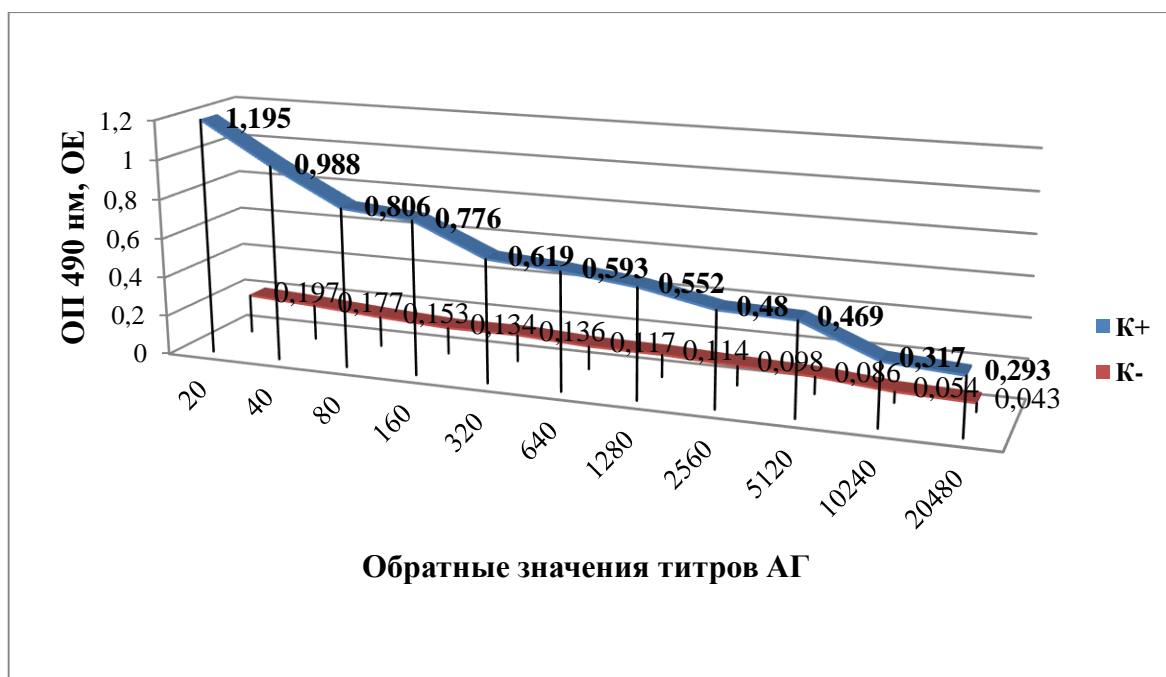


Рисунок 11 – Показатели ОП хроматографически очищенного вирусного материала, отобранного с зоны 20-30% сахарозы ($K_{cp} \geq 2,1$)

Таким образом, можно утверждать, что применение гель-фильтрации позволило повысить активность данной фракции в ИФА на 17,5%. Более низкие значения ОП в остальных образцах предположительно связаны с низкой концентрацией ВСМ.

В результате проведенных исследований нами был разработан способ очистки ВСМ, основанный на двухэтапной дезинтеграции исходной мозговой суспензии, разделении в ступенчатом градиенте плотности сахарозы и хроматографической очистке методом гель-фильтрации.

На каждом этапе процесса производился контроль чистоты, серологической активности и специфичности промежуточных образцов методами аналитического disc-электрофореза, вестерн-блоттинга и ИФА на моделях гипериммунных сывороток, что позволяло отобрать материал, потенциально содержащий наиболее антигенные структуры. В процессе УЦФ в градиенте сахарозы было выявлено, что наибольшее количество белка содержалось в зонах, соответствующих концентрациям растворов до 10% ($1,284 \pm 0,54$ мг/мл), 10-20% ($1,086 \pm 0,17$ мг/мл), 20-30% ($0,914 \pm 0,032$ мг/мл), однако положительной

корреляции с активностью в ИФА выявлено не было. В качестве наиболее активной фракции нами была обозначена АГ ВБ № 3; её мажорные полипептиды как до, так и после хроматографической очистки были представлены диапазонами 64,0-66,2 кДа и 50,0-55,2 кДа, совпадающими с молекулярными массами G- и N-белков ВБ соответственно. Более того, проведение гель-фильтрации позволило значительно снизить содержание вторичных белков. Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой специфичности данной антигенной фракции к гипериммунной сыворотке крови овец, полученной против цельных вирионов производственного штамма ВБ.

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. Это объясняется тем, что образовавшиеся осадки помимо вирусных частиц содержат значительное количество исходных компонентов. Получение высокоочищенного антигенного препарата возможно только при повторном суспендировании первичных осадков и их пересадении. Оптимальной альтернативой модифицированному способу ультрацентрифугирования является химический метод очистки, который способен обеспечить более полную седиментацию вирусных частиц, имеющих наименьшую плотность.

Формирование фазовой системы. В качестве исходного материала для создания экстракционной системы послужил надосадок 20% мозговой суспензии, полученной при низкоскоростном центрифугировании при 5000 g, концентрация белка в котором составила $21,314 \pm 0,76$ мг/мл. Для создания трёхфазной системы полученные осадки, представляющие собой плотную гомогенную массу, ресуспендировали в 2 М растворе сульфата аммония ($\text{pH} = 5,4 \pm 0,1$) и бутаноле-1 в соотношении 1:4:4, после чего подвергли инкубации при температуре $+4^\circ\text{C}$ в

течение 30 минут и низкоскоростному центрифугированию при 4000 g при температуре +10°C в течение 50 минут.

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 (рисунок 12).

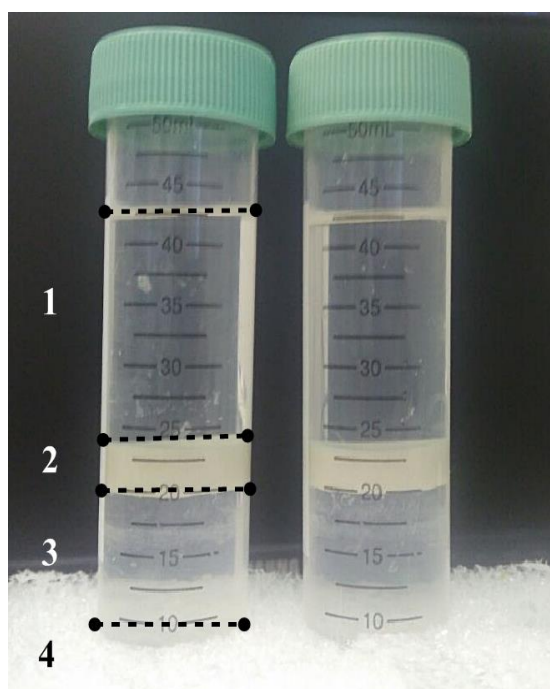


Рисунок 12 – Фазовая система при экстракции: 1 – бутанол-1; 2 – экстрагированная взвесь; 3 – насыщенный раствор сульфата аммония; 4 – дополнительная осадочная фракция.

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.

Экстрагированную взвесь ресуспендировали в 0,02 М трис-HCl буферном растворе в соотношении 1:4, после чего подвергли речентрифугированию при 4000 g при температуре +10°C в течение 45-50 минут.

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. После каждого трёхкратного цикла озвучивания обработанную суспензию подвергали центрифугированию при 4000 g при температуре 20°C в течение 45-50 минут; осадки ресуспендировали и осуществляли повторное озвучивание.

Белковые профили материала, отобранного после каждого цикла озвучивания, подвергли исследованию методом аналитического disc-электрофореза в 12,5% ПААГ с переносом на НЦМ в целях установления диапазона локализации полипептидных фракций; результаты сравнительного анализа компонентов фазовой системы представлены на рисунке 13.

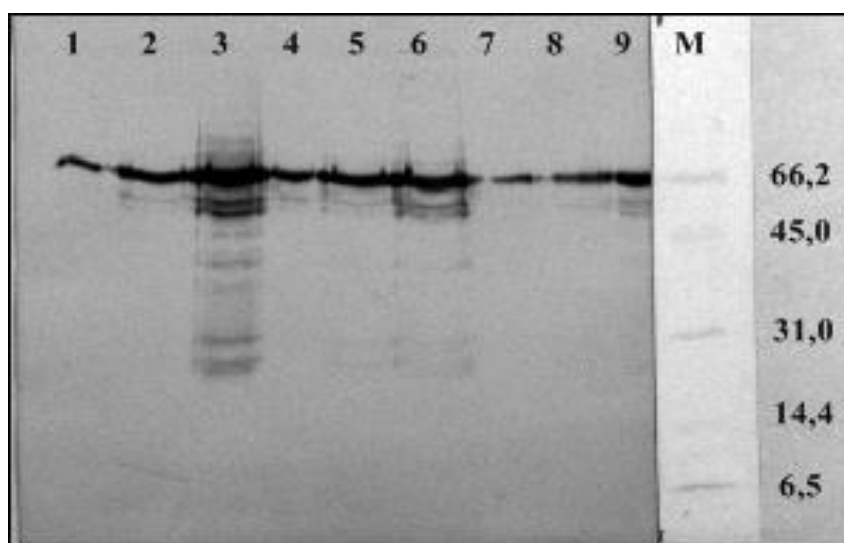


Рисунок 13 – Электрофореграмма компонентов фазовой экстракционной системы в 12,5% ПААГ после переноса материала на НЦМ. **Треки:** 1 – супернатант после УЦФ (37000 g) исходной 20% мозговой суспензии; 2 – супернатант после низкоскоростного ЦФ (5000 g) промежуточной экстрагированной фазы; 3 – ВСМ, полученный после 1 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т; 4, 5 – ВСМ, полученный после 2 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т; 6 – осадочная фракция после низкоскоростного ЦФ (5000 g) исходной 20% мозговой

суспензии; **7, 8** – ВСМ, полученный после 3 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т; **9** – вакцина «Nobivac Rabies» (штамм «Pasteur RIV»); **М** – маркер молекулярных масс Broad Range («Bio-Rad»).

Электрофореграмма показывает 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. Последняя белковая группа присутствовала в образцах ВСМ, отобранных после первого и второго циклов озвучивания, однако белковый профиль ВСМ после третьего цикла озвучивания представлен основным диапазоном 65,0-67,0 кДа, соответствующим молекулярной массе наиболее антигенного G-белка ВБ, и дополнительным – 53,0-55,0 кДа (рисунок 14).

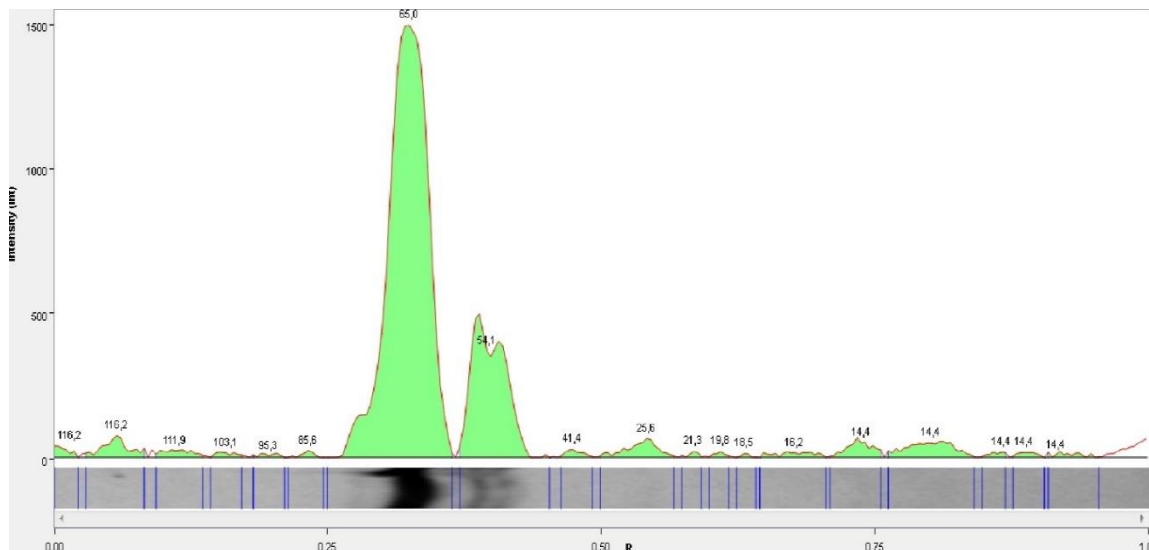


Рисунок 14 – Денситограмма ВСМ, полученного после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т.

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.

Для исследования в ИФА фракции вирусного материала разводили в соотношении 1:20 на 0,1 М КББ, вносили в верхний ряд лунок полистиролового планшета и проводили последовательное двукратное разведение материала на том же буфере по вертикали в разведениях 1:20 – 1:40960. Определение активности и специфичности АГ, иммобилизованного в лунках планшета, проводили с использованием гипериммунной овечьей сыворотки (титр 1:12800) и сыворотки интактных овец в разведениях 1:100 по ранее изложенному алгоритму. Результаты активности исследуемых фракций представлены на рисунке 15.

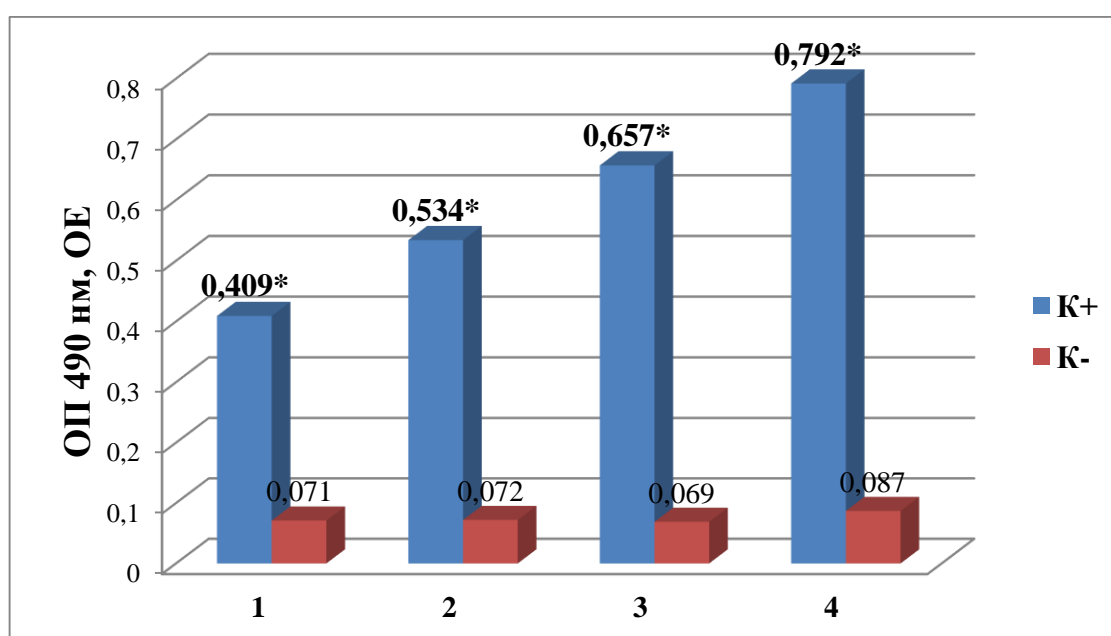


Рисунок 15 – Показатели ОП образцов ВСМ, полученных по результатам трёхфазной экстракции в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в рабочем разведении 1:2560, OE ($K_{сп} \geq 2,1$): **1** – экстрагированная промежуточная фаза до обработки; **2** – ВСМ, полученный после 1 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т; **3** – ВСМ, полученный после 2 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т; **4** – ВСМ, полученный после 3 цикла озвучиваний на УЗДН-2Т.

Примечание: * – достоверно относительно показателей отрицательного контроля, $p < 0,001$.

Из данных графика видна тенденция к возрастанию активности в ИФА антигенсодержащего материала из трёхфазной системы по мере проведения

циклов осаждения. Так, наиболее активным образцом явился ВСМ, полученный после трёхкратной обработки на УЗДН-2Т: его оптическая плотность в рабочем разведении (1:2560) составила $0,792 \pm 0,024$ ОЕ, что превышает данный показатель образца без обработки в 1,94 раза ($p < 0,05$), а титр активности был оценен как 1:10240 ($K_{\text{ср}} = 3,4$). На наш взгляд, именно этот материал представляет наибольший интерес для последующей очистки.

Выделение антигена вируса бешенства этанолом и насыщенным раствором сульфата аммония. Полагая, что присутствующие в конечном супернатанте, полученном после трёх циклов озвучивания на ультразвуковом диспергаторе, остатки клеточного дебриса, метаболиты и прочие низкомолекулярные соединения могут конкурировать с антигенами при сорбции на полистироловые планшеты, было проведено осаждение белков из ВСМ этанолом и насыщенным раствором сульфата аммония (НСА).

Процедуру осаждения производили следующим способом: третичный супернатант озвученной мозговой суспензии подвергали дополнительному УЦФ при 37000 г, к конечному супернатанту приливали охлаждённые до -20°C 96% этанол и 2 М раствор сульфата аммония в соотношениях 1:0,25, 1:0,5, 1:1, 1:2 и выдерживали 30 минут при -20°C . Осадок отделяли на центрифуге для микропробирок Centrifuge MiniSpin центрифугированием при 13000 об/мин в течение 15 минут. К полученным супернатантам добавляли ещё один, равный первоначальному, объём (V) этанола либо НСА и повторно отделяли осадок. Дальнейшее добавление бутанола и ацетона не приводило к агрегации белков и образованию осадка, однако при третичной обработке этанолом и НСА были выделены дополнительные осадочные фракции. Следует отметить, что подобный процесс переосаждения антигенов позволил значительно снизить концентрацию белка в выделяемых образцах, что свидетельствует о существенном сокращении балластной составляющей (таблица 3).

Таблица 3 – Концентрация белка (C_6) в образцах, выделенных в процессе трёхфазной экстракции

Наименование пробы	C_6 , мг/мл
Первично обработанный ВСМ	
Бутанольная (верхняя) фаза	5,649±0,784
Сульфат-аммонийная (нижняя) фаза	6,089±0,431
Супернатант мозговой суспензии, I озвучивание	30,308±2,715
Супернатант мозговой суспензии, II озвучивание	8,097±0,917
Супернатант мозговой суспензии, III озвучивание	2,387±0,131
Фракции ВСМ, осаждённые растворителями	
Осадочная фракция, 0,25 V этанола	1,008±0,056
Осадочная фракция, 0,5 V этанола	1,046±0,033
Осадочная фракция, 1 V этанола	0,924±0,049
Осадочная фракция, 2 V этанола	0,485±0,021
ВБ УЦФ, 1 V этанола	0,338±0,019
Осадочная фракция, 0,25 V НСА	1,971±0,097
Осадочная фракция, 0,5 V НСА	1,654±0,088
Осадочная фракция, 1 V НСА	0,674±0,029
Осадочная фракция, 2 V НСА	0,536±0,034
ВБ УЦФ, 1 V НСА	0,485±0,041

Данные таблицы подтверждают линейное снижение концентрации белка в образцах по мере повторения циклов осаждения: в 62,4 раза ($p < 0,001$) в этанольном и в 122,7 раза ($p < 0,005$) – в сульфат-аммонийном вариантах. С целью определения белковых профилей осаждённых аналитов нами был проведен их электрофоретический анализ в 12,5% ПААГ с окрашиванием коллоидными растворами Кумасси и азотнокислого серебра (рисунок 16 А, Б).

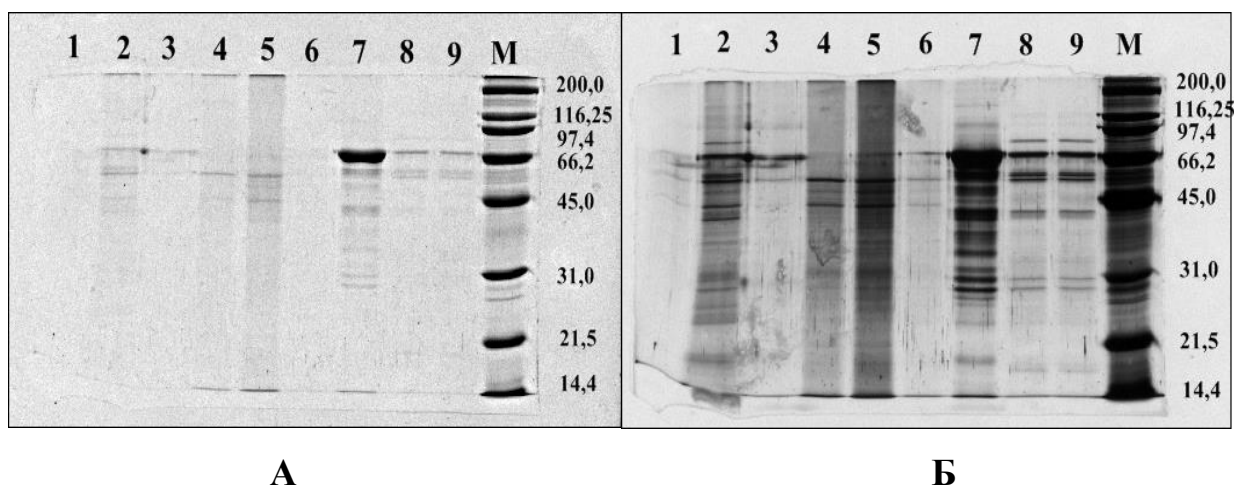


Рисунок 16 – Электрофореграмма, окрашивание по Кумасси (А) и азотнокислым серебром (Б), антигенсодержащего материала после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т, полученного в процессе осаждения. **Треки:** 1 – осадок экстрагированной промежуточной взвеси; 2 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V этанола; 3 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V HCA; 4, 5, 6 – ВСМ, полученный при осаждении бутанольной фазы 1 V этанола; 7 – вакцина «Nobivac Rabies»; 8, 9 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V HCA; М – маркер молекулярных масс Broad Range («Bio-Rad»).

Представленная электрофореграмма показывает, что наиболее удовлетворяющим требованиям экспериментальной серии является белковый профиль фракции, осаждённой этанолом в соотношении 1:1 (трек 2), с концентрацией белка $0,924 \pm 0,049$ мг/мл, а также фракции, осаждённой HCA в соотношении 1:1 (треки 8, 9) с концентрацией $0,674 \pm 0,029$ мг/мл: в окраске коллоидным раствором серебра в данных образцах чётко визуализируется мажорная фракция в диапазоне 66,2 кДа, а также минорные – в диапазоне 50,0-55,0 кДа. Для выявления истинно серопозитивных фракций интересующие образцы были проанализированы нами методом вестерн-блоттинга (рисунок 17).

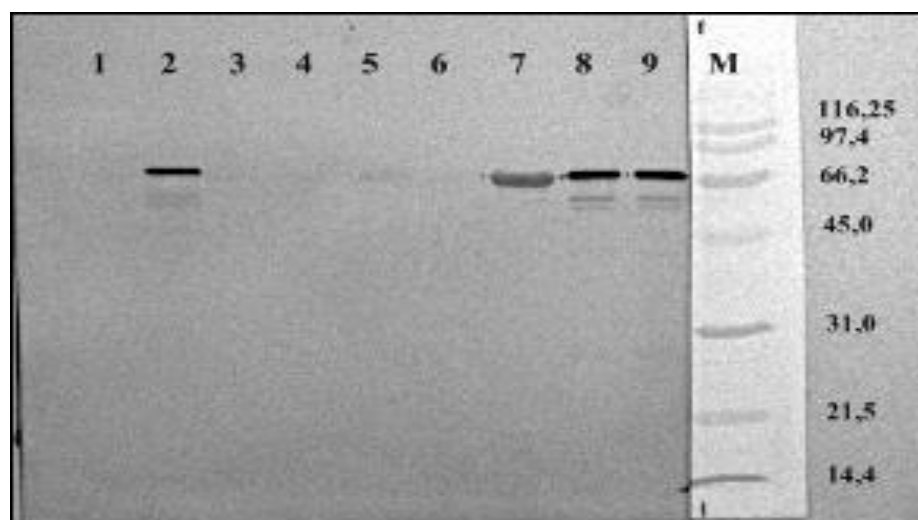


Рисунок 17 – Электрофореграмма после переноса на НЦМ антигенсодержащего материала после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т, полученного в процессе осаждения. **Треки:** 1 – осадок экстрагированной промежуточной взвеси; 2 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V этанола; 3 – ВСМ, полученный при осаждении 0,5 V HCA; 4, 5, 6 – ВСМ, полученный при осаждении бутанольной фазы 1 V этанола; 7 – вакцина «Nobivac Rabies»; 8, 9 – ВСМ, полученный при осаждении 1 V HCA; 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 18).

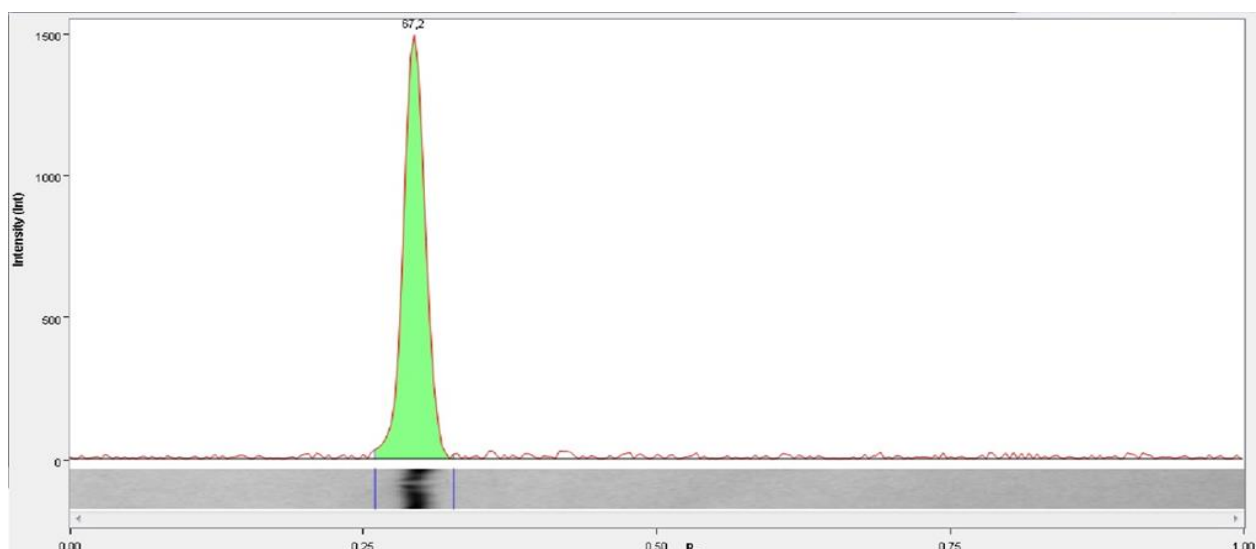


Рисунок 18 – Денситограмма антигенной фракции, полученной путём трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т и последующего осаждения этанолом (1:1).

Также значительную активность в иммуноблоте проявила АГ ВБ, переосаждённая НСА (1:1): молекулярная масса её мажорных полипептидов также варьируется в пределах 64,9-67,3 кДа, однако она сохраняет минорные фракции в зоне 54,0-59,4 кДа.

Следует отметить, что исследование фракций АГ ВБ, переосаждённых этанолом либо НСА в соотношениях 1:0,25, 1:0,5 не принесло удовлетворительных результатов, так как данные образцы при электрофоретическом анализе демонстрировали наличие значительного количества минорных фракций. Также примечателен тот факт, что фракции АГ ВБ, полученные при пробном осаждении двойным объёмом этанола либо НСА, не проявляли должной активности, на основании чего можно предположить возможность истощения ВСМ и констатировать его непригодность для дальнейшей обработки.

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

Следующим этапом нашего исследования явилась оценка серологической активности конечных переосаждённых фракций АГ ВБ в непрямом ИФА. Постановку реакции осуществляли согласно ранее изложенному алгоритму, применяя разведение антигенных образцов до 1:81920. Динамика постадийного распределения серологической активности наиболее диагностически значимых образцов представлена на рисунке 19.

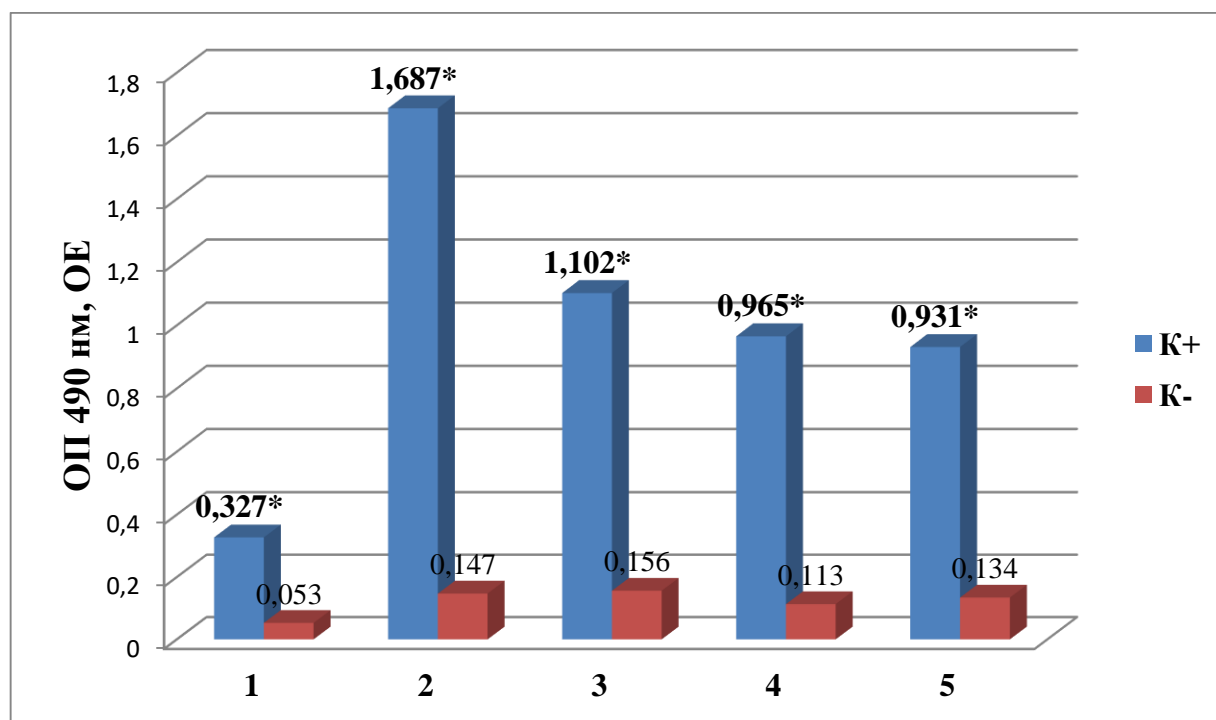


Рисунок 19 – Показатели ОП образцов ВСМ, полученных в результате переосаждения этанолом и НСА в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в рабочем разведении 1:2560, OE ($K_{cp} \geq 2,1$): **1** – осадок экстрагированной промежуточной взвеси; **2** – ВСМ, осаждённый 1 V этанола; **3** – ВСМ, осаждённый 1 V НСА; **4** – ВСМ, полученный в результате осаждения бутанольной фазы 1 V этанола; **5** – ВСМ, осаждённый 0,5 V НСА.

Примечание: * – достоверно относительно показателей отрицательного контроля, $p < 0,001$.

В подтверждение результатов вестерн-блоттинга, наибольшую активность в ИФА проявила мономерная фракция, осаждённая этанолом: показатель её ОП с гипериммунной кроличьей сывороткой составил $1,687 \pm 0,047$ OE, что превышает

таковой сульфат-аммонийной фракции, содержащей дополнительные минорные полипептиды, в 1,53 раза ($p < 0,05$). Это позволяет сделать предположение о том, что присутствие в антигенном материале полипептидной фракции молекулярной массой 50,0-57,4 кДа, соответствующей массе нуклеопротеина ВБ, не определяет иммунохимическую характеристику препарата и, на наш взгляд, не имеет диагностической ценности при изготовлении антигенного компонента для экспресс-тест-систем.

Дальнейшее исследование **этаноловой фракции** в ИФА показало следующие результаты (рисунок 20).

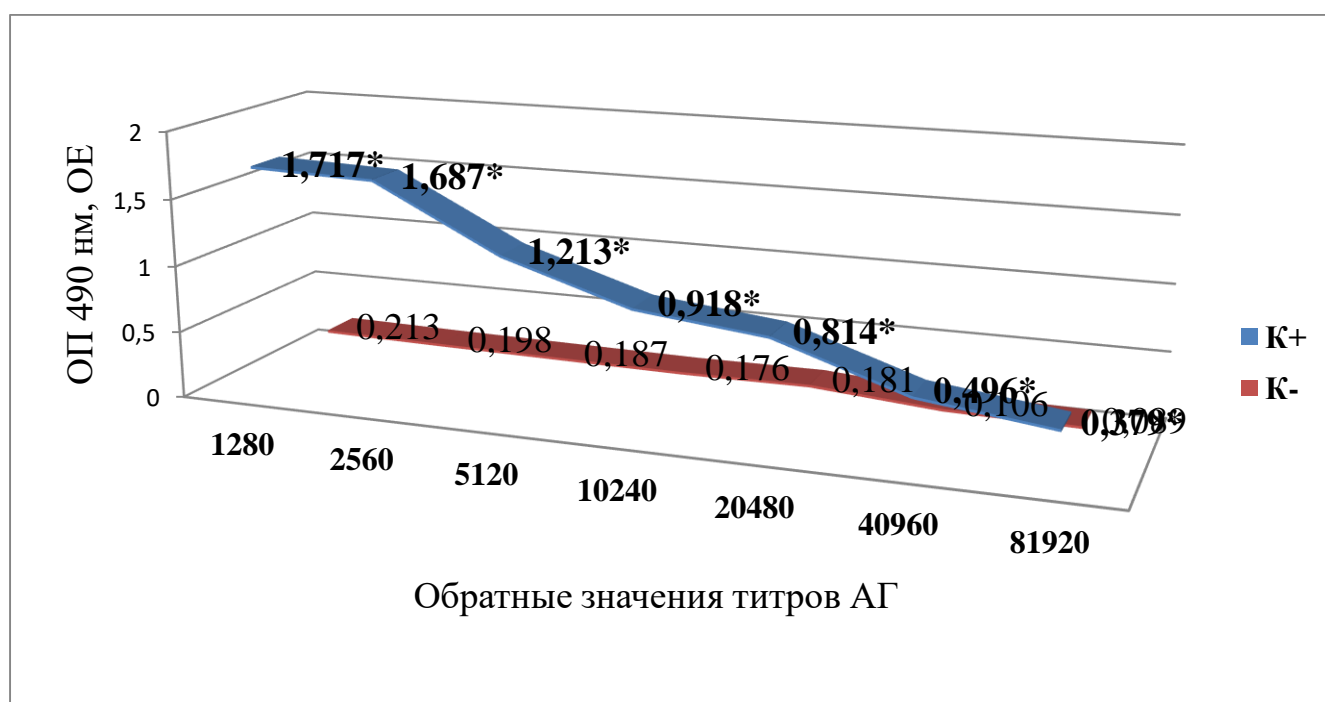


Рисунок 20 – Показатели ОП этаноловой фракции, полученной в результате трёхфазного концентрирования и озвучивания на УЗДН-2Т ($K_{сп} \geq 3,4$).

График доказывает, что динамика реагирования исследуемой фракции с большими разведениями гипериммунных сывороток характеризуется достоверно высоким титром активности (1:81920), линейным снижением показателей ОП и высоким (не ниже 3,4) коэффициентом специфичности, что даёт основания для её рассмотрения в качестве приоритетной для адаптации к производственным условиям.

В результате проведённой серии экспериментов нами был разработан способ получения антигена ВБ, основанный на трёхфазном экстрагировании исходной 20% мозговой суспензии и пересадении выделяемых фракций химически активными веществами.

Поэтапное исследование промежуточных фракций АГ ВБ методами аналитического disc-электрофореза, вестерн-блоттинга и ИФА на моделях гипериммунных сывороток позволило получить представление о приоритетных структурах, определяющих антигенность препарата и установить порядок элиминации балластных веществ. В частности, нами было установлено, что трёхкратное озвучивание ВСМ на ультразвуковом диспергаторе позволяет существенно сократить содержание остатков клеточного дебриса на этапе первичной обработки, и конечный супернатант, титр которого в ИФА составил 1:10240, содержит мажорные полипептидные фракции с молекулярными массами 65,0-67,0 кДа и 53,0-55,0 кДа, соответствующими таковым белков G и N вируса бешенства. Дальнейшее осаждение данной фракции этанолом и НСА позволило избавиться от полипептида, предположительно определяемого нами как N-белок, и добиться выхода высокоочищенного мономерного препарата, содержащего единственную белковую фракцию молекулярной массой 67,2 кДа. Нами было установлено, что конечный высокоочищенный антигенсодержащий материал с концентрацией белка $0,924 \pm 0,049$ мг/мл и титром активности в ИФА 1:81920 удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к производственному компоненту экспресс-тест-систем на основе ИФА. Более того, нами выдвинуто предположение, что присутствие N-белка не влияет на диагностическую эффективность антигенного препарата, так как не участвует в связывании с вируснейтрализующими антителами [213].

Всё вышеизложенное определяет последовательность стадий технологического процесса для получения высокоспецифичного АГ ВБ в промышленных объёмах и использования его для комплектации экспресс-тест-систем на основе ИФА, а также в качестве иммуногена в разработке схем гипериммунизации лабораторных животных.

2.2.3 Разработка схем гипериммунизации лабораторных животных высокоочищенным АГ ВБ

Залогом успешной индикации антигенов ВБ в экспресс-тест-системах на основе ИФА и МФА является их комплектация специфичными диагностическими иммуноглобулинами. Неотъемлемыми этапами конструирования диагностикумов являются наработка диагностических сывороток с последующим выделением высокоочищенных иммуноглобулинов, используемых как для сенсibilизации полистироловых планшетов, так и для приготовления пероксидазного антирабического конъюгата [71].

Активность гипериммунных сывороток оказывает существенное влияние на результаты серологических реакций. Уровень и качество образуемых в организме антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) определяются множеством факторов: степенью очистки и количеством вводимого антигена, способом и кратностью введения, применением вспомогательных веществ [176]. Изыскание адекватных схем иммунизации имеет своей целью получение в короткие сроки сывороток с высоким титром антирабических антител.

На первичном этапе данной экспериментальной серии нами был произведён подбор фракций АГ для иммунизации, базирующийся на анализе характеристик выделенных АГ: фракции, полученной модифицированным методом ультрацентрифугирования с последующей хроматографической очисткой, а также фракции, полученной методом трёхфазной экстракции с последующим осаждением этанолом и НСА. В ходе анализа выделенных фракций определяющими параметрами являлись серологическая активность антигенсодержащего материала, диапазон мажорных полипептидных фракций и наличие минорных примесей.

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. Более того, мономерность выбранного антигенсодержащего материала может позволить получить сыворотки, основные полипептидные фракции которых соответствуют таковым АГ ВБ.

В настоящее время все известные способы получения антирабических сывороток основаны на подкожном введении ВСМ в организм животных с 1-7-дневными интервалами (Бусыгин К. Ф., 1986). Однако в отечественной литературе имеются сведения о том, что клон иммунологической памяти, способный реагировать по вторичному типу, формируется только к 30-му дню после первичной инъекции антигена, а оптимальным интервалом между последующими инъекциями является период не менее 14 суток (Недосеков В. В., 2003). Более того, некоторыми авторами показано, что немаловажное значение имеет способ аппликации антигена. Установлено, что наиболее выраженный иммунитет наблюдается при иммунизации животных внутрикожным способом; в меньшей степени иммуногенная потенция проявляется при внутримышечной и подкожной аппликации (Грибенча С. В., 1993). С учётом вышеописанного можно предположить, что эффективность иммунизации может быть значительно повышена за счёт грундиммунизации, высокой множественности инъектирования и соблюдения интервалов иммунизации.

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 инъектировали 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) (Inject[®] Freund's Complete Adjuvant, Thermo

Scientific). В местах введения антигенного материала с ПАФ наблюдали уплотнения в виде горошин, которые рассасывались через 3-4 недели.

Через 6-8 недель проводили бустерную иммунизацию; при подготовке антигенного материала использовали неполный адъювант Фрейнда (НАФ) (Inject[®] Freund's Incomplete Adjuvant, Thermo Scientific). Инокуляцию материала осуществляли подкожно, симметрично в 2 точки в область плеча (по 0,5 мл в каждую точку). 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. Иммунизацию кроликов второй (n=5) и третьей (n=5) групп проводили вакцинами «Nobivac Rabies» (штамм «Pasteur RIV», «Intervet International B.V.») и «Рабивак» (штамм «Внуково-32», АО «НПО «Микроген») пятикратно. Первая доза вакцины вводилась в смеси с ПАФ в соотношении 1:1 в суммарном объёме 2 мл внутривожно многоточечно вдоль позвоночного столба (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку инъецировали по 0,2 мл антигенного материала. Бустерную иммунизацию проводили спустя 30 суток; вакцину вводили в смеси с НАФ в соотношении 1:1 в суммарном объёме 2 мл подкожно, симметрично в 2 точки в область плеча (по 1 мл в каждую точку). Последующие три иммунизации проводили аналогично с сохранением интервала в 14 суток и дозы иммунизирующего материала.

Контроль динамики антителогенеза, а также изучение белковых профилей продуцируемых АТ осуществляли методами непрямого ИФА и стрипового вестерн-блоттинга с кроличьими сыворотками, отобранными на 0, 7, 14, 21, 42, 60, 74, 88 дни эксперимента.

Постановку ИФА осуществляли следующим образом. Полистироловые планшеты предварительно сенсibilизировали АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ), полученным в процессе первичной очистки методом УЦФ при 37000 g,

разведённым на 0,1 М КББ, в дозе 0,1 мкг на лунку. Сорбцию антигенов на планшетах осуществляли в течение 20 часов при 4°C, после чего их трёхкратно отмывали 0,1 М ФБР-Т в объёме 280 мкл. Далее в лунки вносили исследуемые кроличьи сыворотки, разведённые на 0,1 М ФБР-Т от 1:2 до 1:20480, в объёме 100 мкл, и инкубировали в течение 1,5 часов при 37°C. После трёхкратной отмывки в лунки вносили промышленные кроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich») в разведении 1:50000, и инкубировали в течение 1 часа при +37°C. Активность сывороток на разных стадиях антителогенеза при иммунизации различными антигенными материалами варьировала следующим образом (рисунок 21).

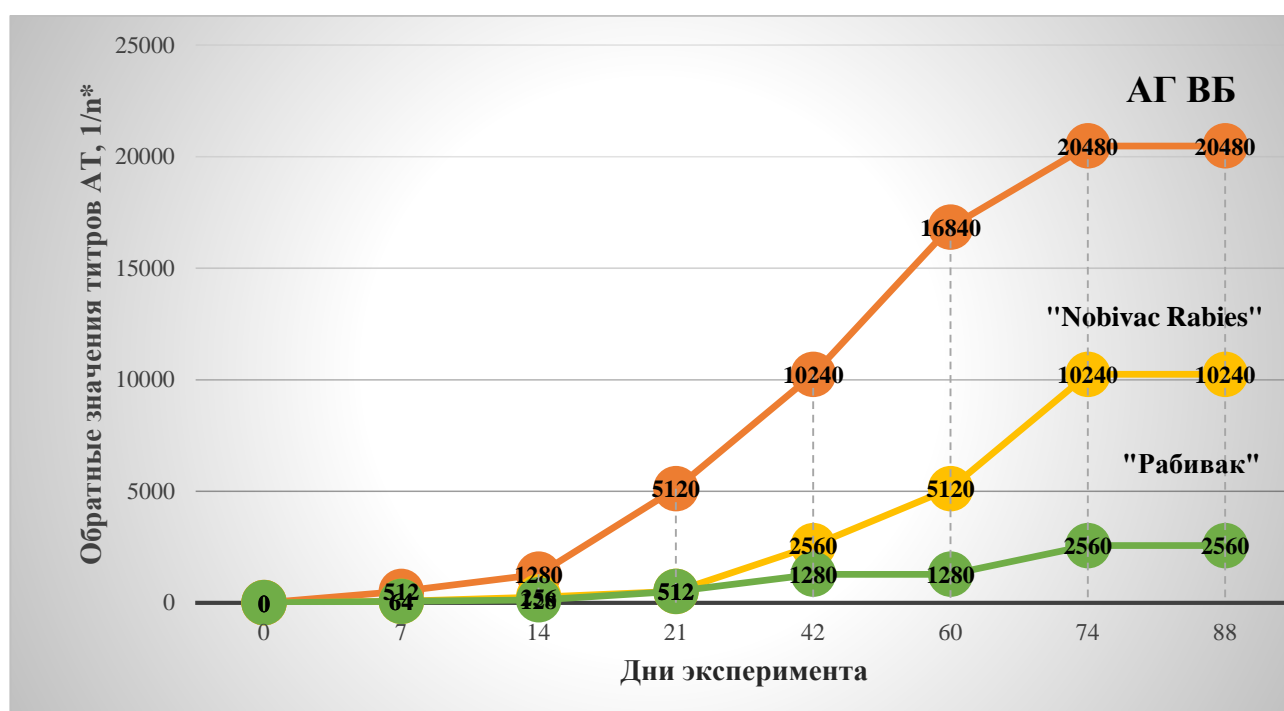


Рисунок 21 – Сравнительная динамика антителогенеза (титры АТ в ИФА) при различных схемах иммунизации кроликов

Из данных графика видно, что наибольшая интенсивность антителогенеза достигалась при иммунизации высокоочищенным АГ ВБ. К 21 дню эксперимента титр АТ в исследуемых сыворотках достиг значения 1:5120, что является удовлетворительным для использования в диагностических целях, а к 42 дню эксперимента – по истечению 6-недельного интервала – увеличился вдвое

(1:10240). Через 14 суток после третьей иммунизации титр АТ возрос до уровня 1:16840. Итогом четвёртой инокуляции антигенного материала стал показатель 1:20480, который оставался стабильным до завершения полного цикла иммунизации. Предположительно, подобная динамика, характеризующаяся накоплением основного количества антител в период, следующий за первичной иммунизацией, связана с высоким качеством используемого материала, его иммуногенными свойствами, мономерностью и минимальным содержанием балластных веществ.

При иммунизации вакциной «Nobivac Rabies» интенсификация накопления АТ приходилась на период с 14 по 60 дни эксперимента; к 74 дню, совпадающему с истечением 14-суточного интервала после пятой, заключительной, иммунизации титр АТ возрастал до уровня 1:10240, что также является значимым показателем для отбора сывороточного материала.

При иммунизации вакциной «Рабивак» уровень напряжённости формируемого иммунитета был несколько ниже: интенсивное накопление АТ отмечалось в период с 21 по 60 дни эксперимента. Конечный титр АТ в данной схеме достигал уровня 1:2560.

Сравнительная характеристика изученных схем гипериммунизации с учётом интервалов между инъекциями материала, доз, способов введения и конечных титров АТ в сыворотках крови в ИФА представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнительная характеристика схем гипериммунизации кроликов

№ инъекции	Способ инокуляции материала	Доза иммунизирующего АГ на кролика	Титры антител в ИФА, 1/n*	К _{сп} , не ниже
Схема № 1 (Высококочищенный АГ ВБ, шт. «Овечий» ГНКИ)				
1	Внутрикожно в 5 точек с каждой стороны вдоль позвоночного столба в смеси с ПАФ; интервал 42 сут	0,1 мл (90 мкг)	10240	2,8
2	Подкожно в 2 точки в области плеча в смеси с НАФ; интервал 14 сут	0,1 мл (90 мкг)	10240	2,9
3	Аналогично; интервал 14 сут	0,1 мл (90 мкг)	16840	3,1
4	Аналогично; интервал 14 сут	0,1 мл (90 мкг)	20480	2,4
5	Аналогично	0,05 мл (45 мкг)	20480	2,6
Схема № 2 (Вакцина «Nobivac Rabies», шт. «Pasteur RIV»)				
1	Внутрикожно в 5 точек с каждой стороны вдоль позвоночного столба в смеси с ПАФ; интервал 30 сут	1,0 мл	256	2,2
2	Подкожно в 2 точки в области плеча в смеси с НАФ; интервал 14 сут	1,0 мл	512	2,2
3	Аналогично; интервал 14 сут	1,0 мл	2560	2,3
4	Аналогично; интервал 14 сут	1,0 мл	5120	2,7
5	Аналогично	1,0 мл	10240	3,1
Схема № 3 (Вакцина «Рабивак», шт. «Внуково-32»)				
1	Внутрикожно в 5 точек с каждой стороны вдоль позвоночного столба в смеси с ПАФ; интервал 30 сут	1,0 мл	128	2,4
2	Подкожно в 2 точки в области плеча в смеси с НАФ; интервал 14 сут	1,0 мл	512	2,2
3	Аналогично; интервал 14 сут	1,0 мл	1280	2,3
4	Аналогично; интервал 14 сут	1,0 мл	2560	2,4
5	Аналогично	1,0 мл	2560	2,7

Примечание: * – указаны обратные значения титров антител

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.

Следует отметить, что показатели оптической плотности высокоактивной сыворотки крови, полученной на АГ ВБ, удовлетворяли производственным требованиям в рабочем разведении (1:2560) (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели оптической плотности сыворотки крови, полученной при иммунизации АГ ВБ

Дни эксперимента	ОП ₄₉₀ исследуемой сыворотки в наибольшем разведении, ОЕ	
	С контрольным положительным АГ	С контрольным отрицательным АГ
0	0,101±0,006	0,092±0,002
7	0,334±0,011	0,087±0,003
14	0,379±0,017	0,097±0,007
21	0,451±0,026	0,112±0,005
42	0,937±0,039	0,154±0,012
60	1,019±0,056	0,167±0,018
74	1,254±0,089	0,189±0,021
88	1,212±0,091	0,176±0,019

Следующим этапом исследования было выявление превалирующих белковых фракций в исследуемых сыворотках крови методом стрипового иммуоблота. Для его постановки проводили электрофорез вакцины «Рабивак» в 12,5% ПААГ с нанесением на сплошную гребёнку, после чего по стандартной методике осуществляли перенос на НЦМ и инкубировали её отдельные стрипы с

исследуемыми сыворотками крови в разведении 1:1000. Результаты исследования представлены на рисунке 22.

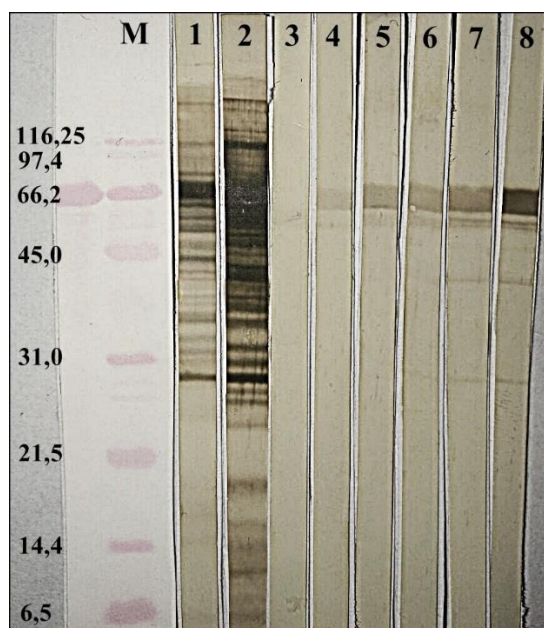


Рисунок 22 – Результаты вестерн-блоттинга с отдельными сыворотками крови, полученными в процессе гипериммунизации кроликов промышленной вакциной и высокоочищенным АГ ВБ, в разведении 1:1000. **Стрипы:** **М** – маркер молекулярных масс Broad Range («Bio-Rad»); **1** – сыворотка, полученная на вакцину «Рабивак» после третьей иммунизации (титр АТ 1:1280), **2** – после четвёртой иммунизации (титр АТ 1:2560); **3** – сыворотка, полученная на высокоочищенный АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ) на 14 день эксперимента; **4** – на 21 день; **5** – на 28 день; **6** – на 35 день; **7** – на 42 день (1:10240); **8** – на 60 день (1:20480).

Из результатов вестерн-блоттинга видно, что на стрипах с сыворотками крови кроликов, иммунизированных вакциной «Рабивак», визуализируется значительное количество балластных белков; наибольшая перегруженность наблюдается в диапазоне 45,0-66,2 кДа. Значительно меньшее количество вторичных белков регистрируется на стрипах с сыворотками крови, полученными на разных этапах иммунизации высокоочищенным АГ ВБ: доминирующая фракция проявляется интенсивнее в зависимости от количества проведённых

иммунизаций и соответствует интересующему нас диапазону – 66,2 кДа, что подтверждается результатами денситограммы (рисунок 23).

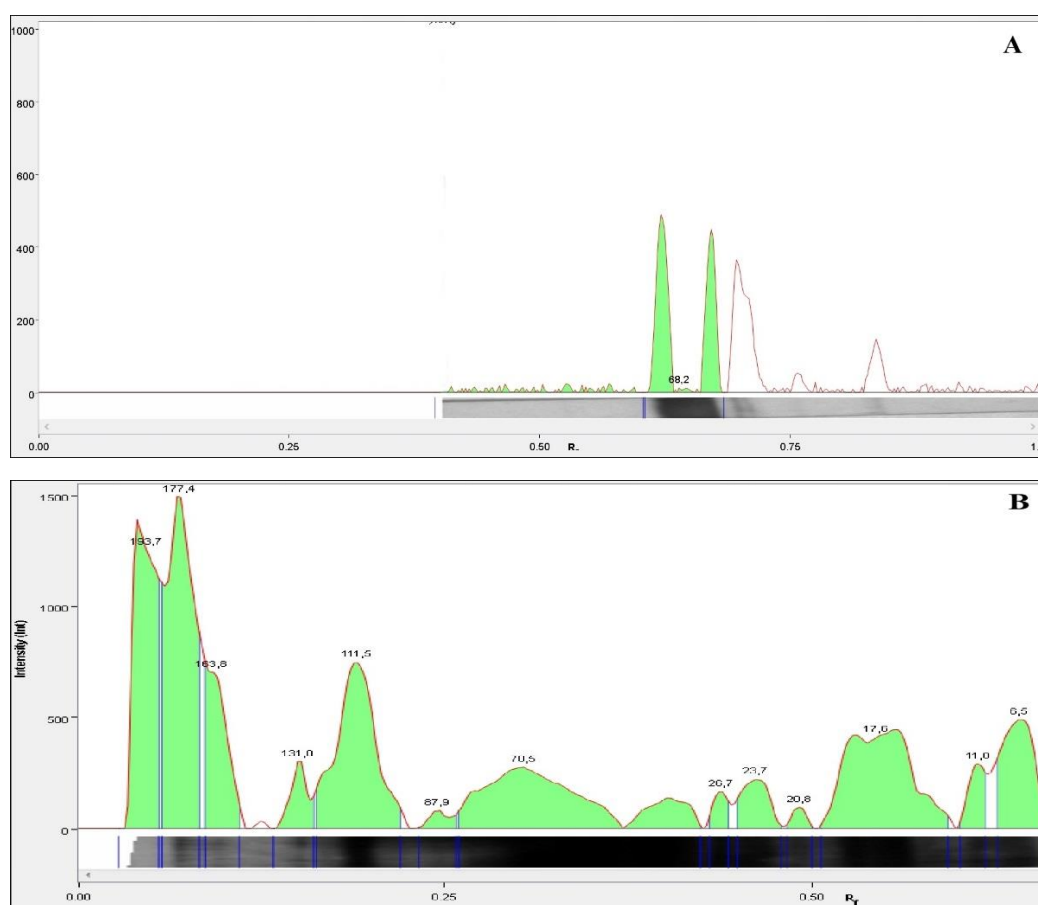


Рисунок 23 – Денситограммы сыворотки крови кроликов, отобранных по завершению циклов иммунизации: А – высокоочищенным АГ ВБ (штамм «Овечий» ГНКИ); В – вакциной «Рабивак» (шт. «Внуково-32»).

Приведённая денситограмма показывает, что белковый профиль сыворотки, полученной на вакцину «Рабивак», представлен полным спектром полипептидов молекулярными массами 6,5-193,7 кДа. 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. В отдельных сывороточных образцах (не более чем в $35,7 \pm 1,8\%$ от общего количества исследованных сывороток) нами было зафиксировано присутствие белковой фракции в диапазоне 50,0-55,0 кДа, однако

её концентрация в общем объёме предельно мала и не имеет статистического значения.

Таким образом, нами в сравнительном аспекте были проанализированы иммуногенные качества выделенной конечной фракции АГ ВБ, на основании чего было установлено, что её использование при гипериммунизации лабораторных животных позволяет получить специфичные сыворотки к единственному мажорному полипептиду молекулярной массой 66,2-68,2 кДа. Запуск второго цикла иммунизации у первой группы кроликов не дал статистически значимых результатов относительно роста уровня АТ. Имеющиеся титры АТ 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

Первостепенное значение в определении диагностической эффективности тест-систем на основе МФА играет степень активности антирабических лиофилизированных ФИТЦ-иммуноглобулинов [34]. Принцип их действия заключается в связывании меченых глобулиновых молекул с различными антигенами ВБ в нейронах исследуемых проб головного мозга, что обеспечивает специфичную флуоресценцию. Именно от степени очистки выделяемых иммуноглобулинов зависит уровень связываемости с искомыми антигенами, что определяет актуальность поиска способов концентрирования специфичных гипериммунных сывороток.

Выделение антирабических иммуноглобулинов. За основу выделения γ -глобулинов из пула тотально отобранных сывороток крови кроликов, полученных путём пятикратной иммунизации высокоочищенным АГ ВБ, был принят классический метод переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония [48], позволяющий, согласно некоторым данным, повысить активность исходной сыворотки в несколько раз.

Процедура переосаждения проводилась следующим образом: к охлажденной и разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:1 сыворотке крови при постоянном помешивании добавляли насыщенный раствор сульфата аммония (5,9 М, рН=5,4±0,2) из расчёта 50% конечного насыщения. Процедуру переосаждения глобулинов проводили трижды; при каждом цикле исходный объём растворяемого осадка после центрифугирования при 5000 г уменьшали на 25%. Осадок после последнего переосаждения промывали в растворе 2,78 М сульфата аммония, после чего проводили исчерпывающий диализ против 0,025 М трис-НСl буфера (рН=7,8±0,1). Конечные глобулиновые фракции подвергались концентрированию в закрытых диализных мешках при отрицательном давлении –500 мБар.

В процессе трёхкратного пересаживания исходной гипериммунной сыворотки насыщенным раствором сульфата аммония, промывкой осадка 2.78 М раствором сульфата аммония и исчерпывающим диализом против 0,025 М трис-НСl буфера с рН 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.

Специфическую активность суммарных кроличьих иммуноглобулинов определяли методом НИФА. Для сорбции на полистироловые планшеты использовали АГ ВБ, полученный после УЦФ, в концентрации 0,1 мкг на лунку. В целях установления специфичности иммуноглобулинов на планшетах сорбировали АГ вируса болезни Ауески. Глобулины в лунки планшета вносили в концентрациях по белку 25, 50, 100, 200, 300 мкг/мл с раститровкой на КББ от 1:10 до 1:81920; инкубацию проводили в течение 2 часов при температуре +37°C. В качестве конъюгата использовали промышленный кроличий конъюгат («Sigma-Aldrich») в разведении 1:50000.

При оценке значений, полученных при учёте реакции, в качестве валидационного порога, исходя из установленных ранее показателей активности исходных сывороток, было принято значение ОП в разведении 1:10240. Результаты исследования представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Активность суммарных кроличьих IgG в ИФА

Концентрация суммарных IgG, мкг/мл	Титр IgG в ИФА, 1/n	ОП ₄₉₀ в рабочем разведении, ОЕ		
		С АГ ВБ	С контрольным отрицательным АГ	С АГ вируса болезни Ауески
25	16400	0,951±0,124 ^{1,2}	0,087±0,008	0,121±0,015
50	20480	1,267±0,135 ^{1,2}	0,093±0,011	0,114±0,009
100	32800	1,818±0,149 ^{1,2}	0,106±0,007	0,137±0,006
200	32800	2,021±0,176 ^{1,2}	0,206±0,016	0,144±0,013
300	40960	2,217±0,181 ^{1,2}	0,214±0,010	0,169±0,018

Примечание:

¹ – достоверно по сравнению с гомологичным антигеном (p=0,001)

² – достоверно по сравнению с гетерологичным антигеном (p<0,005)

Из таблицы видно, что наибольшую активность в ИФА при условии показателей ОП в лунках с отрицательным АГ, не превышающих 0,2 ОЕ, исследуемый IgG проявляет в концентрации 100 мкг/мл, что соответствует разведению исходных суммарных IgG 1:400. Титр иммуноглобулинов указанной концентрации в ИФА достигает 1:32800, ОП в рабочем разведении составляет 1,818±0,149 ОЕ. Значение коэффициента специфичности по отношению к отрицательному АГ в наибольшем разведении составляло не менее 2,8. Показатели ОП в лунках с сорбированным АГ вируса болезни Ауески были сравнимы с таковыми в лунках с отрицательным АГ, что исключает возможность протекания неспецифических реакций.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования выделенных иммуноглобулинов в качестве сырья как для производства антирабических глобулинов для диагностикумов на основе ИФА, так и ФИТЦ-меченых глобулинов для диагностикумов на основе МФА, что позволит существенно повысить выход конечных лиофилизированных продуктов.

Конъюгация иммуноглобулинов с ФИТЦ. Конъюгацию осуществляли методом длительного маркирования [49]. Перед маркировкой раствор иммуноглобулинов подвергали диализу в течение 20 часов при температуре 4°C против КББ. К диализованным иммуноглобулинам вносили по каплям растворённый в ДМСО ФИТЦ («Merck») из расчёта 0,1 мг ФИТЦ на 1 мг белка, что, согласно результатам предварительной серии экспериментов, позволяет достичь оптимальной нагрузки флуорохромом. Маркировку проводили в течение 18 часов при температуре 4°C при постоянном помешивании в условиях затемнения; значение рН в системе поддерживали на уровне $9,3 \pm 0,2$. После завершения инкубации меченые иммуноглобулины подвергали гель-фильтрации на хроматографической колонке, предварительно промытой стартовым 0,025 М трис-НСI буферным раствором, с использованием геля сефадекс G-25. На гистограмме хроматографической очистки наблюдали отчётливое отделение связанного с ФИТЦ белка, вышедшего в виде острого пика, от свободного. Основные характеристики меченого иммуноглобулина по результатам спектрального анализа представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика суммарных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с ФИТЦ (ФАГ)

Показатель	IgG+ФИТЦ ($C_6 = 39,8 \pm 1,71$ мг/мл)
ОП при длине волны 280 нм, ОЕ	$0,954 \pm 0,042$
ОП при длине волны 495 нм, ОЕ	$1,371 \pm 0,059$
$ОП_{495} / ОП_{280}$	1,437
Концентрация меченого белка, мг/мл	$1,23 \pm 0,015$
Соотношение ФИТЦ/белок	13,34
Плотность мечения, г/см ³	14,4

Согласно методике ориентировочного определения концентрации белка (K_6) и молярного соотношения ФИТЦ/белок ($K_{p/6}$) [56], соотношение $ОП_{495} / ОП_{280}$ для

ФИТЦ, как правило, располагается в пределах значений 0,5-1,5. Полученное нами значение данного показателя (1,437) удовлетворяет заданному диапазону и обеспечивает оптимальную плотность мечения, равную 14,4 г/см³.

Определение активности ФАГ в МФА. Активность и специфичность полученного препарата испытывали на мазках-отпечатках, приготовленных из четырёх отделов головного мозга (продолговатого 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. Результаты учёта реакции по крестовой системе представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты исследования активности ФАГ в МФА

Рабочее разведение	Интенсивность свечения		
	АГ вируса бешенства	Контрольный отрицательный антиген	АГ вируса болезни Ауески
1:4	++++	–	–
1:8	++++	–	–
1:16	++++	–	–
1:32	++++	–	–
1:64	+++	–	–

Из таблицы видно, что наибольшую флуоресцирующую активность исследуемый ФАГ проявляет в разведении 1:32. Данное разведение обеспечивает степень свечения, оцениваемое в 4 креста, и исключает фоновое и неспецифическое свечения. При исследовании ФАГ в разведениях 1:4, 1:8 и 1:16 наблюдалось фоновое свечение различной степени интенсивности. По нашему предположению, подобная побочная активность может быть связана как с

высокой чувствительностью самого метода, так и с относительно высокой концентрацией меченого белка в конечном ФАГ.

Визуализация активности ФАГ методом прямой иммунофлуоресценции в разведении 1:32 представлена на рисунке 24.

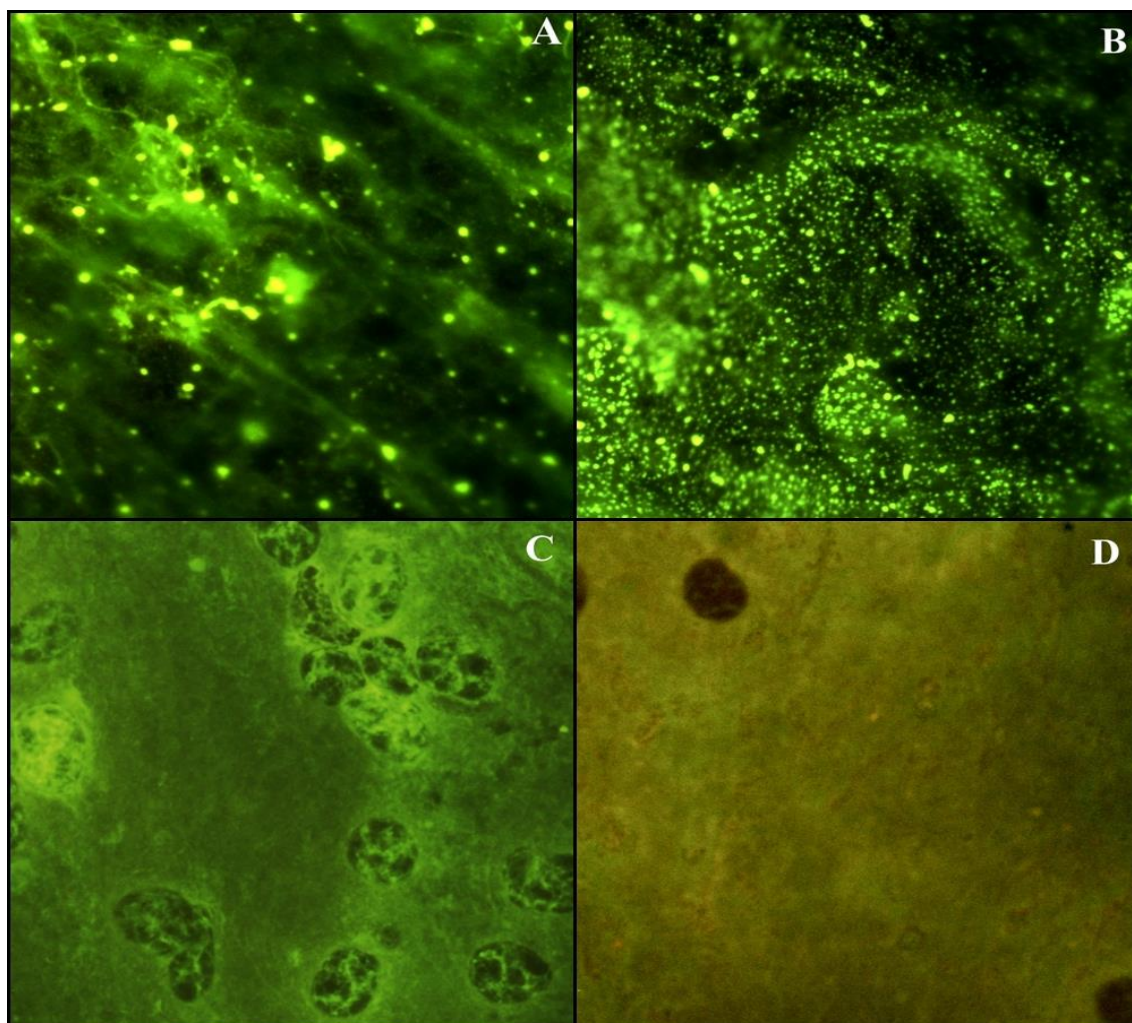


Рисунок 24 – Оценка активности полученных ФАГ в МФА (разведение 1:32) на мазках-отпечатках головного мозга мышей, заражённых ВБ «Овечий» (ГНКИ), увеличение 100х. Участки, окрашенные: **A, B** – испытуемым ФАГ; **C** – КФА («ФЦТРБ-ВНИВИ»); **D** – предварительно – АнГ («ФЦТРБ-ВНИВИ») и ФАГ.

Из результатов люминесцентной микроскопии видно, что полученный ФАГ в разведении 1:32 даёт удовлетворительную картину флуоресценции, выражающуюся в чёткой визуализации характерных для антигенных комплексов ВБ округлых жёлто-зелёных включений. Используемые контроли также

характеризовались типичной для данных препаратов визуализацией: при окраске КФГ наблюдали умеренное фоновое свечение, при предварительной обработке АНГ признаков свечения не регистрировали.

Таким образом, в результате исследований нами 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, выразившейся 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

Первостепенным критерием, определяющим диагностическую эффективность антирабических иммуноглобулинов в «сэндвич»-ИФА, является степень их связываемости с антигенами ВБ, содержащимися в патологическом материале. В настоящее время предпочтение при индикации АГ ВБ в пробах патологического материала наряду с МФА отдаётся методу «сэндвич»-ИФА ввиду его большей экономической эффективности, экспрессности и возможности инструментального учёта результатов [103]. В связи с этим задачей данного этапа исследований явилась оптимизация условий постановки «сэндвич»-ИФА с выделенными нами антирабическими иммуноглобулинами, полученными в результате иммунизации кроликов высокоочищенной фракцией АГ ВБ.

Оптимизация условий постановки «сэндвич»-ИФА. В качестве иммуносорбентов нами были использованы кроличьи иммуноглобулины, выделенные методом трёхкратной преципитации насыщенным раствором сульфата аммония ($C_6=9,4\pm 0,87$ мг/мл). Для определения оптимальной концентрации иммуноглобулинов на лунку планшета сорбцию образцов осуществляли в разведениях 1:200 (47 мкг), 1:400 (23,5 мкг), 1:800 (11,8 мкг), 1:1600 (5,9 мкг), 1:3200 (3 мкг), 1:6400 (1,5 мкг), 1:12800 (0,8 мкг), 1:25600 (0,4 мкг). Иммуноглобулины сорбировали на 0,05 М КББ ($pH=9,5\pm 0,1$) при температуре $+4^\circ C$. Длительность сорбции в различных вариантах постановки реакции составляла 12, 16, 20, 24 часа. Сенсибилизированные планшеты трёхкратно отмывали ФБР-Т. После отмывки в первый ряд лунок планшета (по вертикали) вносили образцы антигенных фракций: АГ ВБ, полученную модифицированным методом разделения в градиенте плотности сахарозы с последующей хроматографической очисткой ($C_6=1,086\pm 0,17$ мг/мл), и АГ ВБ, выделенный методом трёхфазной экстракции с последующим трёхкратным озвучиванием на ультразвуковом диспергаторе и переосаждением этанолом ($C_6=0,924\pm 0,049$ мг/мл). Каждый антигенный образец титровали по горизонтали

до 1:20480. В качестве отрицательного контроля использовали контрольный отрицательный антиген (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). Длительность инкубации планшетов с антигенными фракциями составляла 1, 1,5, 2 часа, после чего планшеты повторно подвергали отмывке ФБР-Т, вносили антирабический пероксидазный конъюгат («ФЦТРБ-ВНИВИ») в разведениях 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, и инкубировали также в течение 1-2 часов. После повторной отмывки планшетов производился учёт реакции.

При анализе результатов реакции принимались во внимание следующие показатели: значения ОП в наибольшем разведении на планшете (1:4096) в лунках с положительным контролем должны быть не менее 0,5 ОЕ, с отрицательным – не более 0,15 ОЕ ($K_{сп} \geq 3,3$); продолжительность детекции ферментативной метки при внесении субстратной смеси должна ограничиваться временным промежутком 5-15 минут; при учёте численных значений показатели ОП должны убывать линейно в прямой зависимости от концентрации сорбированных иммунных комплексов. На наш взгляд, соблюдение вышеперечисленных условий обеспечивает получение достоверных показателей при детекции АГ ВБ в патологическом материале.

По результатам данной серии экспериментов нами было установлено, что **оптимальная продолжительность инкубаций** составила: а) при сорбции иммуноглобулинов – 20 часов при температуре 4°C; б) с антигенным материалом – не менее 1,5 и не более 2 часов при температуре 37°C; в) с антирабическим пероксидазным конъюгатом – 1 час при температуре 37°C. В качестве рабочего разведения конъюгата было принято 1:3200, при котором продолжительность детекции метки хромогеном составила 8-10 минут. Использование меньших разведений конъюгата нецелесообразно ввиду проявления фоновой активности в лунках с отрицательным контролем.

Результаты исследования активности иммуноглобулинов с различными разведениями антигенных фракций представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты исследования высокоспецифичных антирабических иммуноглобулинов в «сэндвич»-ИФА

Разведение ИММУНОГЛОБУЛИНОВ	ОП ₄₉₀ , ОЕ									
	АГ ВБ (модифицированный метод разделения в градиенте сахарозы)					АГ ВБ (трёхфазная экстракция с озвучиванием)				
	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
1:200	1,291 ±0,112*	1,303 ±0,124*	1,193 ±0,148*	1,125 ±0,137*	1,090 ±0,103*	1,640 ±0,194*	1,563 ±0,141*	1,420 ±0,189*	1,363 ±0,151*	1,191 ±0,113*
1:400	1,134 ±0,098*	1,105 ±0,116*	1,080 ±0,141*	0,987 ±0,134*	0,980 ±0,111*	1,591 ±0,192*	1,485 ±0,136*	1,391 ±0,181*	1,278 ±0,143*	1,080 ±0,101*
1:800	1,141 ±0,101*	0,959 ±0,108*	0,903 ±0,124*	0,841 ±0,121*	0,867 ±0,096*	1,480 ±0,187*	1,223 ±0,150*	1,288 ±0,079*	1,118 ±0,138*	0,967 ±0,091*
1:1600	0,837 ±0,112*	0,815 ±0,097*	0,817 ±0,116*	0,764 ±0,115*	0,736 ±0,091*	1,439 ±0,148*	1,191 ±0,098*	1,182 ±0,081*	1,042 ±0,096*	0,889 ±0,097*
1:3200	0,637 ±0,086*	0,660 ±0,081*	0,736 ±0,111*	0,684 ±0,095*	0,605 ±0,062*	1,405 ±0,157*	1,082 ±0,089*	1,083 ±0,071*	0,992 ±0,085*	0,841 ±0,091*
1:6400	0,380 ±0,063*	0,470 ±0,067*	0,557 ±0,096*	0,471 ±0,083*	0,488 ±0,071**	1,248 ±0,146*	0,932 ±0,115*	0,917 ±0,064*	0,876 ±0,081*	0,798 ±0,083*
1:12800	0,266 ±0,054*	0,263 ±0,041*	0,352 ±0,067**	0,322 ±0,067**	0,396 ±0,063**	0,843 ±0,062*	0,894 ±0,081*	0,812 ±0,052*	0,726 ±0,078*	0,735 ±0,071*
1:25600	0,241 ±0,036*	0,222 ±0,039*	0,225 ±0,061**	0,215 ±0,045**	0,301 ±0,047**	0,832 ±0,054*	0,811 ±0,069**	0,732 ±0,057**	0,688 ±0,063*	0,671 ±0,068*

Примечание: * – достоверно относительно показателей отрицательного контроля, $p < 0,001$;

** – достоверно относительно показателей отрицательного контроля, $p < 0,005$.

Из таблицы видно, что фракция АГ ВБ, полученная модифицированным методом разделения в градиенте плотности сахарозы, проявлявшая активность в титре до 1:20480, удовлетворяла заданным нами параметрам пороговых значений ОП для положительного образца в разведениях до 1:5120. В разведениях от 1:5120 и выше заданное значение $\geq 0,5$ ОЕ достигалось только в образце, инкубированном в разведении 1:6400 ($0,557 \pm 0,096$ ОЕ). Оптимальной комбинацией компонентов в данном случае можно считать АГ ВБ в разведении 1:5120 и иммуноглобулины в разведении 1:800; также реакция протекает удовлетворительно с иммуноглобулинами в разведении 1:1600 и любым разведением АГ ВБ в диапазоне 1:1280 – 1:10240: при тестировании вариантов

скорость детекции метки, а также значения ОП не имели статистически значимых отличий.

При испытаниях фракции АГ ВБ, полученной методом трёхфазной экстракции с последующим переосаждением этанолом, наблюдается значительно бóльшая активность, сохранявшаяся при разведении 1:20480 на уровне $\geq 0,6$ ОЕ. Для обеспечения высокой чувствительности тест-системы оптимальной может считаться комбинация АГ ВБ в разведениях 1:5120 – 1:10240, что при разведении иммуноглобулинов 1:1600 – 1:3200 позволяет получить результат на уровне 0,8-1,0 ОЕ.

При сопоставлении показателей, полученных при тестировании высокоспецифичных иммуноглобулинов с двумя приоритетными антигенными фракциями, было выявлено, что в разведении 1:10240 активность фракции АГ ВБ, полученной методом трёхфазного экстрагирования, выше в 1,64 раза ($p=0,001$). По нашим предположениям, это может быть связано с тем, что степень обременённости данной фракции вторичными примесями несколько ниже, чем фракции, полученной градиентным разделением, чем и обеспечивается лучшая связываемость иммуноглобулинов с антигенными детерминантами ВБ.

Между результатами испытаний иммуноглобулинов с антигенными фракциями выявлена положительная линейная корреляция ($r=0,91$, $p<0,05$).

Оценка специфичности иммуноглобулинов. Для оценки специфичности тестируемых иммуноглобулинов для разных вариантов постановки ИФА исследовали 10% мозговые суспензии интактных животных разных видов ($n=25$): овец ($n=5$), кроликов ($n=5$), белых мышей ($n=15$). Расчётная ОП отрицательных проб составила $0,048 \pm 0,006$ ОЕ. В данных условиях специфичность реакции составила 100%.

Оценка эффективности иммуноглобулинов для детекции АГ ВБ в патологическом материале. 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, сенсibilизированных в аналогичных концентрациях по белку суммарными иммуноглобулинами, полученными в результате иммунизации кроликов вакциной «Рабивак». В качестве отрицательного контроля использовали мозговую суспензию лисицы, отрицательную в МФА; в качестве контрольного теста для верификации результатов ИФА проводили РН на белых мышах методом последовательных десятикратных разведений.

Результаты исследования проб патологического материала с применением иммуноглобулинов разной степени специфичности представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты детекции АГ ВБ в пробах патологического материала в «сэндвич»-ИФА с иммуноглобулинами разной степени специфичности

№ экспертизы	«Сэндвич»-ИФА в условиях сенсibilизации:				Результат в МФА
	Суммарными IgG кролика, «Рабивак»		Суммарными IgG кролика, высокоочищенный АГ ВБ		
	ОП ₄₉₀ , ОЕ	Результат	ОП ₄₉₀ , ОЕ	Результат	
013	0,978±0,189*	+	1,076±0,164*	+	+++
014	1,198±0,213*	+	1,487±0,188*	+	++++
017	0,788±0,117*	+	0,817±0,132*	+	+++
019	0,705±0,122*	+	0,798±0,099*	+	+++
020	0,856±0,134*	+	0,911±0,087*	+	+++
021	0,998±0,106*	+	1,102±0,112*	+	++++
023	0,587±0,099*	+	0,736±0,079*	+	+++
024	0,568±0,101*	+	0,615±0,061*	+	+++
029	0,321±0,051*	+	0,347±0,045*	+	++
041	0,406±0,044*	+	0,432±0,047*	+	++
044	0,543±0,041*	+	0,587±0,031*	+	+++
045	0,677±0,058*	+	0,698±0,052*	+	+++
059	1,087±0,128*	+	1,314±0,187*	+	++++
064	0,308±0,088*	+	0,376±0,091*	+	++
065	0,596±0,076*	+	0,718±0,061*	+	+++
074	0,608±0,065*	+	0,677±0,046*	+	+++
087	0,685±0,051*	+	0,712±0,034*	+	+++
092	0,199±0,016	–	0,279±0,019*	+	++
101	0,172±0,011	–	0,246±0,021*	+	+
001 (отр. К)	0,169±0,009	–	0,172±0,011	–	–

Примечание: * – достоверно относительно показателей отрицательного контроля ($p \leq 0,001$)

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 $4,1 \pm 0,05$ ($p=0,001$) $\lg LD_{50}/\text{см}^3$.

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 повторях; 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 рабическими 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 сенсibilизации 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.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных экспериментов были разработаны и апробированы в производственных условиях два основных способа получения высокоочищенного антигена вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ. Белками, проявляющими серологическую активность, являются доминирующий в спектре белок с молекулярной массой 66-67 кДа, соответствующий гликопротеину вируса бешенства, и представленный в меньших количествах белок с молекулярной массой 50-55 кДа, соответствующий нуклеопротеину вируса бешенства.

Описанные модифицированные способы, базирующиеся на ультрацентрифугировании с разделением в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с последующей хроматографической очисткой посредством гель-фильтрации, и на трёхфазной экстракции с озвучиванием УЗДН и последующим осаждением этанолом, позволяют препаративно наработать высокоочищенный монофракционный антиген ВБ, проявляющий высокую серологическую активность в непрямом ИФА (до $1,892 \pm 0,141$ ОЕ). Также разработаны и описаны основные схемы гипериммунизации кроликов при помощи искомого антигена, позволяющие получить высокоактивную сыворотку с титром вируснейтрализующих антител 1:20480.

Изыскан способ выделения высокоспецифичных монофракционных антирабических иммуноглобулинов, основанный на трёхкратном переосаждении насыщенным раствором сульфатом аммония и гель-фильтрацией с использованием ДЭАЭ-целлюлозы, что позволяет получить ФИТЦ-конъюгированный продукт с титром в МФА 1:64.

Оценены полипептидные профили выделенных антигенных фракций; изучена диагностическая активность выделенных иммуноглобулинов для индикации АГ ВБ эпизоотических штаммов в патологическом материале. Высокая чувствительность и специфичность антигенных и глобулиновых компонентов были подтверждены методами ИФА, МФА, аналитического disc-электрофореза и белкового вестерн-блота.

Таким образом, 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.

Полученные результаты обоснованы следующими выводами:

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. Метод трёхфазной экстракции с трёхкратным озвучиванием УЗДН и последующим осаждением этанолом позволяет 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. Разработанные схемы гипериммунизации кроликов с использованием высокоочищенных АГ ВБ позволяют получить высокоспецифичную гипериммунную сыворотку с титром в ИФА до 1:20480.

4. Методический подход к наработке высокоспецифичных монофракционных ФИТЦ-конъюгированных иммуноглобулинов с титром в МФА 1:64 обеспечивает высокую специфичность индикации антигена вируса бешенства и отсутствие неспецифической флуоресценции в рабочем разведении.

5. Подтверждена высокая диагностическая эффективность иммуноглобулинов для индикации антигенов эпизоотических штаммов ВБ в патологическом материале посредством ИФА и МФА, 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 УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – антиген

АнГ – антирабический глобулин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВБ – вирус бешенства

ВБА – вирус болезни Ауески

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ВНИВИ – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт

ВНК-21 – перевиваемая линия клеток почек сирийских хомячков

ВСМ – вируссодержащий материал

ГНКИ – Государственный научно-контрольный институт

ДИЧ – дефектные интерферирующие частицы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ДЭАЭ-целлюлоза – диэтиламиноэтил-целлюлоза

ИГХА – иммуногистохимический анализ

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохроматографический анализ

ИЭТ – изоэлектрическая точка

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

кДа – килодальтон

КРС – крупный рогатый скот

КФГ – контрольный флуоресцирующий глобулин

МЕ – международные единицы

МКА – моноклональные антитела

МРС – мелкий рогатый скот

МФА – метод флуоресцирующих антител

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

НГУК-1 – перевиваемая линия клеток невриномы Гассерова узла крысы

- НК** – негативное контрастирование
- НСА** – насыщенный раствор сульфата аммония
- НЦМ** – нитроцеллюлозная мембрана
- ОП** – оптическая плотность
- ОТ-ПЦР** – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция
- ОФД** – ортофенилендиамин
- ПААГ** – полиакриламидный гель
- ПАФ** – полный адъювант Фрейнда
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ** – полиэтиленгликоль
- РДП** – реакция диффузной преципитации
- РИФ** – реакция иммунофлуоресценции
- РЛА** – реакция латекс-агглютинации
- РН** – реакция нейтрализации
- РНК** – рибонуклеиновая кислота
- ТЕМЕД** – N, N, N, N'-тетраметилендиамин
- ТМБ** – тетраметиленбензидин
- УЦФ** – ультрацентрифугирование
- ФАГ** – флуоресцирующий антирабический глобулин
- ФБР (Т)** – фосфатно-буферный раствор (с твином)
- ФИТЦ** – флуоресцеин-5-изотиоцианат
- ФСР-Т** – фосфатно-солевой раствор с твином
- ФЦБ** – фосфатно-цитратный буфер
- ФЦТРБ** – Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности
- CVS** – Challenge virus strain (стандартный вирусный штамм)
- IgG** – иммуноглобулины класса G

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акинъшина, Т. В. Разработка набора реагентов для оценки эффективности поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства в серологических реакциях: автореф. дисс.канд.биол.наук: 03.00.23 / Т. В. Акинъшина. – Щёлково, 2005. – 28 с.
2. Баррет, Т. Вирусология: методы / Т. Баррет, П. Берд, Дж. Клегг и др. — М.: Мир, 1988. — 344 с.
3. Бельчихина, А. В. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации / А. В. Бельчихина, А. К. Караулов // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 1. – С. 15-19.
4. Березина, Е. С. Значение мелких диких псовых в заболеваемости людей бешенством в России / Е. С. Березина, Г. Н. Сидоров, Е. М. Полещук и др. // Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные. – 2011. – № 2. – С. 26-30.
5. Бусыгин, К.Ф. Диагностика бешенства методом флуоресцирующих антител / К.Ф. Бусыгин // Тез. докл. Всесоюз. конф. – Казань, 1983. – С. 136.
6. Ведерников, В. А. Бешенство животных в Российской Федерации / В. А. Ведерников, И. В. Балдина // Бюллетень «Вакцинация». – 2005. – С. 7-12.
7. Грибенча, С. В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка – главного иммуногена вируса бешенства / С. В. Грибенча, М. А. Лосин, Л. Ф. Грибенча // Вопросы вирусологии. – 2012. – № 3. – С. 44-47.
8. Грибенча, С. В. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства / С. В. Грибенча, А. Ю. Козлов, Л. В. Костина и др. // Вопросы вирусологии. – 2013. – №5. – С. 38-43.
9. Груздев, К. Н. Бешенство животных / К. Н. Груздев, В. В. Недосеков. – М.: «АКВАРИУМ». – 2001. – 304 с.
10. Гулюкин, А. М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации вируса бешенства для иммунологического

- мониторинга данного зооноза / А. М. Гулюкин // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 3. – С. 5-10.
11. Дедков, В. Г. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени // В. Г. Дедков, А. А. Девяткин, Е. М. Полещук и др. // Вопросы вирусологии. – 2016. – № 61 (5). – С. 235-240.
12. Евсеева, С.Д. Изучение зависимости качества таблеток-приманок антирабической вакцины от физических характеристик таблетированной смеси / С.Д. Евсеева, Е.М. Хрипунов, Д.О. Баньковский // Вет. и мед. аспекты зооантропонозов. – Покров, 2003. – Ч.1. – С. 202–204.
13. Елаков, А. Л. Меры борьбы с бешенством у безнадзорных и диких животных / А. Л. Елаков // VetPharma. – 2013. – № 5, 6. – С. 24-27.
14. Елаков, А.Л. Стандартизация контроля антирабических вакцин / А.Л. Елаков, В.И. Уласов, В.С. Иванов // Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках национального проекта «Развитие агропромышленного комплекса», 28-30 ноября 2008 г.: матер. Межд. конф. – Казань, 2007. – С. 54–57.
15. Ефимова, М. А. Выделение, очистка и оценка серологической активности антигенов вируса бешенства / М. А. Ефимова, К. С. Хаертынов, А. Ф. Арсланова и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 4. – С. 24-27.
16. Заволока, А. А. О бешенстве / А. А. Заволока // VetPharma. – 2013. – № 4. – С. 24-31.
17. Иванов, А. В. Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за бешенством: методическое руководство / А. В. Иванов, Н. А. Хисматуллина, Р. Х. Юсупов и др. – Казань, ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2007. – 95 с.
18. Карпова, М. А. Разработка тест-системы для выявления вируса инфекционного некроза поджелудочной железы (IPNV) иммуноферментным методом: дисс. канд. биол. наук: 06.02.02, 03.01.06. / М. А. Карпова. – Москва, 2018. – 118 с.

19. Колосов, А. Е. Оценка опасности заражения бешенством в северных регионах России // А. Е. Колосов, А. В. Романов, А. Г. Вялицын / Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 5(59). – С. 141-145.
20. Комитет экспертов ВОЗ по бешенству: VIII доклад. – Серия технических докладов; 824. – ВОЗ, Женева, 1994. – 126 с.
21. Кошеметов, Ж. К. Оптимизация условий постановки полимеразной цепной реакции для диагностики бешенства / Ж. К. Кошеметов, В. М. Матвеева, В. М. Строчков и др. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – №11 (121). – 2014. – С. 121-122.
22. Латышев, О. Е. Дифференциальная диагностика коронавирусных гастроэнтеритов свиней / О. Е. Латышев, М. А. Арутюнова, О. В. Елисеева и др. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2014. – № 2. – С. 22-24.
23. Литвиненко, Ю. В. Бешенство. Актуальные вопросы / Ю. В. Литвиненко // Молодой ученый. — 2016. — №22. — С. 104-111.
24. Макаров, В. В. Бешенство / В. В. Макаров // Российский ветеринарный журнал. – 2017. – № 1. – С. 27-32.
25. Макаров, В. В. Оральная вакцинация лисиц против бешенства безальтернативна / В. В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2009. – № 4. – С. 104-107.
26. Мамунц, А. Х. Сложности прижизненной диагностики бешенства. Клиническое наблюдение / А. Х. Мамунц, Г. В. Батракова, И. Н. Трефилов и др. // Пермский медицинский журнал. – 2018. – Т. XXXV. – № 4. – С. 88-93.
27. Метлин, А. Е. Меры борьбы с бешенством животных / А. Е. Метлин // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 1. – С. 6-9.
28. Метлин, А. Е. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства / А. Е. Метлин, Th. Muller, С. С. Рыбаков и др. // Ветеринария. – 2009. – №8. – С. 18-25.

29. Мовсесянц, А. А. Бешенство: особенности современной эпизоотической и эпидемиологической ситуации в России / А. А. Мовсесянц // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 5 (60). – С. 4-7.
30. Мовсесянц, А. А. К вопросу о применении гетерологичного антирабического иммуноглобулина для специфической профилактики бешенства у людей / А. А. Мовсесянц // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – № 5 (84). – С. 85-89.
31. Мовсесянц, А. А. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства / А. А. Мовсесянц, Ю. В. Олефир // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2019. – № 1. – С. 10-16.
32. Назаров, Н. А. Разработка реакции агглютинации латекса для диагностики бешенства животных / Н. А. Назаров, Н. М. Михайлина, А. В. Молодкин и др. // Труды федерального центра охраны здоровья животных. – 2007. – № 5. – С. 186-201.
33. Нафеев, А. А. Бешенство – природно-очаговый зооноз: современная характеристика эпизоотического процесса / А. А. Нафеев, Д. А. Васильев, Н. И. Пелевина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – С. 80-85.
34. Недосеков, В. В. Обнаружение антител к вирусу бешенства иммунопероксидазным монослойным методом / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, В.И. Жестерев и др. // Проблемы инфекционной патологии с/х животных: матер. Межд. конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. – Владимир, 1997. – С. 181–182.
35. Никифоров, В. В. Бешенство. Актуальные вопросы / В. В. Никифоров, М. Г. Авдеева // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2017. – С. 295-307.
36. Остерман, Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М., МЦНМО, 2002. – 248 с.
37. Патент RU 2 272 809 С2, 27.03.2006. Специфичные в отношении вируса бешенства нейтрализующие моноклональные антитела человека и нуклеиновые кислоты и связанные с ними способы / Д. К. Хупер, Б. Дитцшольд. – 2006.

38. Петровский, Б. В. (ред). Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ), 3-е издание. – М.: Советская энциклопедия, 1975. – Т. 21. Рабдовирусы. – С. 511-526.
39. Пономарёв, А. П. Совершенствование метода очистки и концентрирования вируса бешенства / А.П. Пономарёв, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков и др. // Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтфельдта-Якоба и другие прионные болезни; листиреоз, болезнь Ауески, болезнь Тешина: матер. Межд. науч. – практ. – конф. – Покров, 2001. – С. 49.
40. Рахманин, П. В. Иммуноферментная тест-система для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови привитых против бешенства кошек и собак: автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.23 / П. В. Рахманин. – Щёлково, 2008. – 30 с.
41. Сазонкин, В. Н. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и роль диких животных в формировании природных очагов инфекции / В. Н. Сазонкин, М. А. Семёнова // Болезни диких животных: труды: Междунар. науч.-практ. конф. – ГНУ ВНИИВВиМ Покров, 2004. – С. 38-41.
42. Смаилова, А.С. Разработка современных средств специфической профилактики природного бешенства / А.С. Смаилова, В.А. Бабак, И.А. Пунтус и др. // Научный форум: Инновационная наука: сб. ст. по материалам V междунар. науч.-практ. конф. — № 4(5). — М., Изд. «МЦНО», 2017. — С. 22-31.
43. Сологуб, Т.В. Выявление антител к вирусу бешенства методом ингибирования твердофазного ИФА / Т.В. Сологуб, В.Н. Никитин, Н.Ф. Вишняков // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. – Покров, 1992. – Ч. 2. – С. 261–262.
44. Стародубова, Е. С. Вакцины против бешенства: современное состояние и перспективы развития / Е. С. Стародубова, О. В. Преображенская, Ю. В. Кузьменко // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49. – № 4. – С. 577-584.
45. Сухарьков, А. Ю. Анализ эффективности оральной вакцинации против бешенства животных в дикой среде на примере некоторых регионов Российской Федерации / А. Ю. Сухарьков, Н. А. Назаров, А. Е. Метлин и др. // Особо опасные болезни животных. – Т. 8. – № 1. – С. 57-63.

46. Сухарьков, А. Ю. Разработка методов оценки оральной антирабической вакцинации животных: автореферат дисс. канд. биол. наук: 03.02.02 / Сухарьков А. Ю. – Владимир, 2014. – 25 с.
47. Турсунов, К. Получение рекомбинантного иммуногенного домена нуклеопротеина вируса бешенства / К. Турсунов, А. Бегалиева, Б. Инирбай и др. // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2015. – № 3. – С. 51-57.
48. Фримель, Г. Иммунологические методы / Г. Фримель. – М.: Медицина, 1987. – С. 390-396.
49. Хадарцев, О. С. Бешенство в Российской Федерации в 2000-2005 годах / О. С. Хадарцев, Ю. М. Фёдоров, Н. Я. Жилина и др. // Информационный бюллетень. Роспотребнадзор. – Москва, 2006. – 20 с.
50. Хисматуллина, Н. А. Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика: учебно-методическое пособие в иллюстрациях / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, А.М. Гулюкин. – М.: Колос, 2010. – 54 с.
51. Хисматуллина, Н.А. Нормативная документация к «Набору препаратов для лабораторной диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА)» / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, А.Н. Чернов, утв. Россельхознадзором 03.03.2008.
52. Хисматуллина, Н. А. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве / Н. А. Хисматуллина, Р. Х. Юсупов, М. А. Селимов, С. Р. Янбарисова // Вопросы вирусологии. – 2001. – №5. – С. 45-48.
53. Хисматуллина, Н. А. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) / Н. А. Хисматуллина, А. М. Гулюкин, Э. А. Шуралёв и др. // Гены и клетки. – 2014. – Т. 9. – № 3. – С. 276-280.
54. Цибулькин, А. П. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга / А. П. Цибулькин, И. М. Хаертынова, Н. Г. Уразов и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – № 61 (2). – С. 91-102.
55. Черкасский, Б. Л. Бешенство / Б. Л. Черкасский. – М.: Медицина, 1966. – 20 с.

56. Чернов, А. Н. Эпизоотологический мониторинг и разработка средств диагностики бешенства, болезни Ауески и бруцеллёза: автореф. дисс. докт. биол. наук: 06.02.02 / А. Н. Чернов. – Уфа, 2013. – 47 с.
57. Шарапова, Н. А. Выделение гликопротеида из фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» и конструирование на его основе диагностикума для дот-иммуноанализа / Н. А. Шарапова, М. Н. Киреев, Е. Г. Абрамова // Acta Biomedica Scientifica. – 2012. – № 5 (87). – С. 347-350.
58. Aaslestad, H. G. Recovery of protective activity in rabies virus vaccines concentrated and purified by four different methods / H. G. Aaslestad, T. J. Wiktor // Appl Microbiol. – 1972. – V. 24, № 1. – P. 37-43.
59. Aavula, S. M. A novel in vitro ELISA for estimation of glycoprotein content in human rabies vaccines / S. M. Aavula, G. Abhinay, S. V. Nimmagadda // J Immunoassay Immunochem. – 2017. – V. 38, № 4. – P. 400-410.
60. Abhinay, G. A novel site-II directed glycoprotein estimation ELISA to aid rabies vaccine manufacture for veterinary and human use. / G. Abhinay, S. Dessain, A. Srikanth // Vaccine. – 2014. – V. 32, № 2. – P. 209-213.
61. Adriaenssens, E. M. CIM® monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles / E. M. Adriaenssens, S. M. Lehman, K. Vandersteegen // Virology. – 2012. – V. 434, № 2. – P. 265-270.
62. Ahmed, K. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals / K. Ahmed, O. Wimalaratne, N. Dahal / Am J Trop Med Hyg. // 2012. – V. 86, № 4. – P. 736-740.
63. Aikimbayev, A. Fighting rabies in Eastern Europe, the Middle East and Central Asia--experts call for a regional initiative for rabies elimination / A. Aikimbayev, D. Briggs, G. Coltan et al. // Zoonoses Public Health. – 2014. – № 61 (3). – P. 219-26.
64. Albertini, A. A. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex / A. A. Albertini, A. K. Wernimont, T. Muziol. et al. // Science. – 2006. – V. 313, № 5785. – P. 360-363.

65. Algeo, T. P. Oral rabies vaccination variation in tetracycline biomarking among Ohio raccoons / T. P. Algeo, G. Norhenberg, R. Hale et al. // *J Wild Dis.* – 2013. – V. 49, № 2. – P. 332-337.
66. Andrade, M. C. Immune response produced by anti-rabies vaccines in marmosets (*Callithrix* sp) / M. C. Andrade, A. N. de Oliveira, P. C. Romijn et al. // *Rev Soc Bras Med Trop.* – 1999. – V. 32, № 5. – P. 533-540.
67. Aravindh Babu, R. P. Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals / R. P. Aravindh Babu, S. Manoharan, P. Ramadass et al. // *Indian J Virol.* – 2012. – V. 23, № 3. – P. 392–396.
68. Atanasiu, P. Glycosylation and isoelectric properties of complete and defective rabies viruses / P. Atanasiu, P. Perrin, S. Favre et al. // *Ann Microbiol (Paris).* – 1979. – V. 130, № 1. – P. 85-101.
69. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes / D. Baltimore // *Bacteriol. Rev.* – 1971. – V. 35. – P. 235-241.
70. Barrat, J. Rabies diagnosis / J. Barrat, E. Picard-Meyer, F. Cliquet // *Dev Biol (Basel).* – 2006. – V. 125. – P. 71-77.
71. Bedeković, T. Evaluation of ELISA for the detection of rabies virus antibodies from the thoracic liquid and muscle extract samples in the monitoring of fox oral vaccination campaigns / T. Bedekovic, I. Simic, N. Kresic et al. // *BMC Vet Res.* – 2016. – V. 12. – P. 76.
72. Bingham, J. Ante-mortem diagnosis of human rabies by the skin biopsy technique: three case reports from Zimbabwe / J. Bingham, P. Mlambo // *Cent Afr J Med.* – 1995. – V. 41, № 8. – P. 258-260.
73. Biswal, M., Ratho R. K., Mishra B. Role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of human rabies / M. Biswal, R. K. Ratho, B. Mishra // *Indian J Med Res.* – 2012. – V. 135, № 6. – P. 837–842.
74. Bumgarner, R. DNA microarrays: Types, Applications and their future / R. Bumgarner // *Curr Protoc Mol Biol.* – 2013. – Ch. 22. – Unit 22.1.

75. Cardoso, T. C. Chicken embryo related (CER) cell line for quantification of rabies neutralizing antibody by fluorescent focus inhibition test / T. C. Cardoso, L. H. da Silva, S. E. da Silva et al. // *Biologicals*. – 2006. – V. 34. – № 1. – P. 29-32.
76. Chenik, K. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N), existence of two N binding sites on P protein / M. Chenik, K. Chebli, Y. Gaudin et al. // *J. Gen. Virol.* – 1994. – Vol. 75. – P. 2889-2896.
77. Clark, H. F. Parks NF, Wunner WH. Defective interfering particles of fixed rabies viruses: lack of correlation with attenuation or auto-interference in mice / H. F. Clark. N. F. Parks, W. H. Wunner // *J Gen Virol.* – 1981. – V. 52, № 2. – P. 245-258.
78. Cliquet, F. Rabies in Europe: what are the risks? / F. Cliquet, E. Picard-Meyer, E. Robardet // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2014. – V. 12, № 8. – P. 905-908.
79. Crepin, P. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid / P. Crepin, L. Audry, Y. Rotivel et al. // *J Clin Microbiol.* – 1998. – № 36(4). – P. 1117-1121.
80. Cuccuru, M. A., Dessi D., Rappelli P., Fiori P. L. A simple, rapid and inexpensive technique to bind small peptides to polystyrene surfaces for immunoenzymatic assays / M. A. Cuccuru, D. Dessi, P. Rappelli et al. // *J Immunol Methods.* – 2012. – V. 382, № 1-2. – P. 216-219.
81. Dacheux L. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens / L. Dacheux, J. M. Reynes, P. Buchy et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – V. 47. – P. 1410 – 1417
82. Dastkhosh, M. Cell culture extraction and purification of rabies virus nucleoprotein / M. Dastkhosh, P. Rahimi, S. Haghighat et al. // *Jundishapur journal of microbiology.* – 2014. – V. 7, № 9. – e11734.
83. Dastjerdi, A. Oligonucleotide Microarray: Applications for Lyssavirus Speciation / A. Dastjerdi, A. R. Fooks, N. Johnson // *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention.* – 2014. – P. 193-203.
84. Dato, V. M. A systematic review of human bat rabies virus variant cases: evaluating unprotected physical contact with claws and teeth in support of accurate risk

- assessments / V. M. Dato, E. R. Campagnolo, J. Long et al. // *PLoS One*. – 2016. – V. 11, № 7. – e0159443.
85. David, D. Role of the RT-PCR method in ante-mortem & post-mortem rabies diagnosis / D. David // *Indian J Med Res*. – 2012. – V. 135, № 6. – P. 809–811.
86. Davis, B. M. Everything You Always Wanted to Know About Rabies Virus (But Were Afraid to Ask) / B. M. Davis, G. F. Rall, M. J. Schnell // *Annu Rev Virol*. – 2015. – № 1. – P. 451-471.
87. Dean, D. J. The fluorescent antibody test. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowsky H, editors. *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th edition / D. J. Dean, M. K. Ableseth, P. Atanasiu // Geneva, Switzerland. – WHO; 1996. – P. 88–96.
88. Dibia, I. N. Phylogeography of the current rabies viruses in Indonesia / I. N. Dibia, B. Sumiarto, H. Susetya et al. / *Phylogeography of the current rabies viruses in Indonesia* // *J Vet Sci*. – 2015. – V. 16, № 4. – P. 459-66.
89. Dietzschold, B. Structure and function of rabies virus glycoprotein / B. Dietzschold, J. H. Cox, G. Schneider // *Dev Biol Stand*. – 1978. – V. 40. – P. 45-55.
90. Dietzgen, R. G. Family Rhabdoviridae. *Virus Taxonomy (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)* / R. G. Dietzgen, C. H. Calisher, G. Kurath et al // Elsevier Academic Press; Oxford. – 2011. – P. 686–714. 86.
91. Duong, V. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings / V. Duong, A. Tarantola, S. Ong // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – V. 46. – P. 107–114.
92. Duong-Ly, K. C. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation / K. C. Duong-Ly, S. B. Gabelli // *Methods Enzymol*. – 2014. – V. 541. – P. 85-94.
93. Dupuis, M. Comparison of automated quantitative reverse transcription-PCR and direct fluorescent-antibody detection for routine rabies diagnosis in the United States / M. Dupuis, S. Brunt, K. Appler et al. // *J Clin Microbiol*. – 2015. – V. 53, № 9. – P. 2983–2989.
94. Eaton, S. L. *A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies* / S. L. Eaton, M. L. Hurtado, K. J. Oldknow et al. // *J Vis Exp*. – 2014. – V. 93: 52099.

95. Eggerbauer, E. Evaluation of Six Commercially Available Rapid Immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material / E. Eggerbauer, P. Benedictis, B. Hoffmann // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – V. 10, № 6. – e0004776.
96. Elmgren, L. D. Diagnosis and analysis of a recent case of human rabies in Canada / L. D. Elmgren, S. A. Nadin-Davis, F. T. Muldoon et al. // *Can J Infect Dis.* – 2002. – V. 13, № 2. – P. 129–133.
97. Ermine, A. Rapid diagnosis of rabies infection by means of a dot hybridization assay / A. Ermine, N. Tordo, H. Tsiang // *Mol Cell Probes.* – 1988. – V. 2, № 1. – P. 75-82.
98. Faber, M. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response / M. Faber, P. Rojjanaporn, S. S. Hodawadekar et al. // *J Virol.* – 2002. – V. 76, № 7. – P. 3374–3381.
99. Faye, M. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus / M. Faye, L. Dacheux, M. Weidmann // *J Virol Methods.* – 2017. – V. 243. – P. 120-130
100. Finke, S. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication / S. Finke, R. Mueller-Waldeck, K. K. Conzelmann // *J Gen Virol.* – 2003. – V. 84, № 6. – P. 1613-1621.
101. Finke, S. Virus Promoters Determine Interference by Defective RNAs: Selective Amplification of Mini-RNA Vectors and Rescue from cDNA by a 3' Copy-Back Ambisense Rabies Virus / S. Finke, K. K. Conzelmann // *J Virol.* – 1999. – V. 73, № 5. – P. 3818–3825.
102. Flamand, A. Mechanisms of rabies virus neutralization / A. Flamand, H. Raux, Y. Gaudin et al. // *Virology.* – 1993. – V. 194, № 1. – P. 302-313.
103. Fooks, A. R. Rabies / A. R. Fooks, F. Cliquet, S. Finke // *Nat Rev Dis Primers.* – 2017. – № 3. – P. 170-179.
104. Fooks, A. R. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century / A. R. Fooks, N. Johnson, C. M. Freuling // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2009. – V. 3, № 9. – e530.

105. Fu, Z. F. Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein / Z.F. Fu, Y. Zheng, W.H. Wunner et al. // *J. Virol.* – 1994. – Vol. 200. – P. 590-597.
106. Fu, Z. F. Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine / Z. F. Fu, B. Dietzschold, C. L. Schumacher et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1991. – № 88(5). – P. 2001–2005.
107. Fujii, H. Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein / H. Fujii, Y. Takita-Sonoda, K. Mifune et al. // *Journal of General Virology.* – 1994. – V. 75. – P. 1339-1344.
108. Global Alliance for Rabies Control: 160 people die of rabies every day; <https://rabiesalliance.org>
109. Guichard, P. Three dimensional morphology of rabies virus studied by cryo-electron tomography / P. Guichard, T. Krell, M. Chevalier et al. // *J Struct Biol.* – 2011. – V. 176, № 1. – P. 32-40.
110. Hebert, G. A. Determination of the Optimal Ammonium Sulfate Concentration for the Fractionation of Rabbit, Sheep, Horse, and Goat Antisera / G. A. Hebert, P. L. Pelham, B. Pittman // *Appl Microbiol.* – 1973. – V. 25, № 1. – P. 26–36.
111. Hemachudha, T. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management / T. Hemachudha, G. Ugolini, S. Wacharapluesadee // *Lancet Neurol.* – 2013. – № 12(5). – P. 498-513.
112. Hicks, D. J. Developments in rabies vaccines / D. J. Hicks, A. R. Fooks, N. Johnson // *Clin Exp Immunol.* – 2012. – V. 169, № 3. – P. 199–204.
113. Hoffmann, B. Improved Safety for Molecular Diagnosis of Classical Rabies Viruses by Use of a TaqMan Real-Time Reverse Transcription-PCR “Double Check” Strategy / B. Hoffman, C. M. Freuling, P. R. Wakeley et al. // *J Clin Microbiol.* – 2010. – № 48(11). – P. 3970–3978.
114. Hostnik, P. The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus / P. Hostnik // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2000. – V. 47, № 6. – P. 423-427.

115. Hronovský, V. Cultivation of the fixed rabies virus strain HEP Flury in vitro. I. Adaptation of the HEP Flury strain to the human diploid cell line HEL / V. Hronovsky, J. Cinatl, R. Benda // *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* – 1973. – V. 17, № 3. – P. 285-293.
116. Hummeler, K. Structure and Development of Rabies Virus in Tissue Culture / K. Hummeler, H. Koprowski, T. J. Wiktor // *J Virol.* – 1967. – V. 1, № 1. – P. 152–170.
117. Ito, Y. Centrifugal precipitation chromatography: principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation / Y. Ito // *Anal Biochem.* – 2000. – V. 277, № 1. – P. 143-153.
118. Jakava-Viljanen, M. Evolutionary trends of European bat lyssavirus type 2 including genetic characterization of Finnish strains of human and bat origin 24 years apart / M. Jakava-Viljanen, T. M. Nokireki, T. Vapalahti et al. // *Archives of Virology.* – 2015. – V. 160, № 6. – P. 1489–1498.
119. Jiang, W. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation / W. Jiang, R. Hua, M. Wei // *Sci Rep.* – 2015. – V. 5. – 13875.
120. Jogai, S. Immunohistochemical study of human rabies / S. Jogai, B. D. Radotra, A. K. Banerjee // *Neuropathology.* – 2000. – V. 20, № 3. – P. 197-203.
121. Kadam, S. S. Comparative Analysis of Routine Laboratory Diagnostic Tests for Rabies / S. S. Kadar, A. A. Sherikar, V. S. Pingale // *Indian J Virol.* – 2011. – V. 22, № 2. – P. 142–145.
122. Kallel, H. Immunogenicity and efficacy of an in-house developed cell-culture derived veterinarian rabies vaccine / H. Kallel, M. F. Diouani, H. Loukil et al. // *Vaccine.* – 2006. – V. 24, № 22. – P. 4856-4862.
123. Kasempimolporn, S. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test / S. Kasempimolporn, W. Saengseesom, B. Lumlertdacha et al. // *J Clin Microbiol.* – 2000. – V. 38, № 8. – P. 3098-3099.
124. Katayama, S. A new quantitative method for rabies virus by detection of nucleoprotein in virion using ELISA / S. Katayama, M. Yamanaka, S. Ota et al. // *Journal of Veterinary Medicine Science.* – 1998. – Vol. 61. – P. 411-416.

125. Koser, L. M. Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens / L. M. Koser, J. P. McGettigan, G. S. Tan et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – V. 101, № 25. – P. 9405–9410.
126. Krnić, A. Giuseppe and Aloysius Frari's Works on Rabies and History of Frari Medical Family of Šibenik, Dalmatia / A. Krnic // *Croat Med J.* – 2007. – V. 48, № 3. – P. 378–390.
127. Kuzmin, I. V. Shimoni bat virus, a new representative of the Lyssavirus genus / I. V. Kuzmin, A. E. Mayer, M. Niezgoda et al. // *Virus Res.* – 2010. – V. 149, № 2. – P. 197-210.
128. Kuzmin, I. V. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions / I. V. Kuzmin, X. Wu, N. Tordo et al. // *Virus Res.* – 2008. – V. 136, № 1-2. – P. 81-90.
129. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
130. Léchenne, M. Validation of a Rapid Rabies Diagnostic Tool for Field Surveillance in Developing Countries / M. Lechenne, K. Naissengar, A. Lepelletier et al. // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – V. 10, № 10. – e0005010.
131. Lembo, T. Evaluation of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis / T. Lembo, M. Niezgoda, A. Velasco-Villa et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2006. – V. 12, № 1. – P. 310–313.
132. Li, Y. Rabies virus phosphoprotein interacts with ribosomal protein L9 and affects rabies virus replication / Y. Li, W. Dong, Y. Shi et al. // *Virology.* – 2016. – V. 488. – P. 216-224.
133. Lin, A. V. Direct ELISA / A. V. Lin // *Methods Mol Biol.* – 2015. – V. 1318. – P. 61-67.
134. Lin, A. V. Indirect ELISA / A. V. Lin // *Methods Mol Biol.* – 2015. – V. 1318. – P. 51-59.
135. Ma, B. Characteristics and viral propagation properties of a new human diploid cell line, Walvax-2, and its suitability as a candidate cell substrate for vaccine

- production / B. Ma, L. He, Y. L. Zhang et al. // *Hum Vaccin Immunother.* – 2015. – V.11, № 4. – P. 998-1009.
136. Madhusudana, S. N. A passive haemagglutination test for rabies antibodies using rabies glycoprotein coupled erythrocytes / S. N. Madhusudana, R. Shamsundar, S. Saraswati // *J Commun Dis.* – 2003. – V. 356 № 1. – P. 24-31.
137. Madhusudana, S. N. Antemortem diagnosis and prevention of human rabies / S. N. Madhusudana, S. N. Sukumaran // *Ann Indian Acad Neurol.* – 2008. – V. 11, № 1. – P. 3–12.
138. Madhusudana, S. N., Saraswati S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies / S. N. Madhusudana, S. Saraswati // *J Clin Virol.* – 2003. – V. 27, № 2. – P. 129-35.
139. Mahshid, D. Cell Culture Extraction and Purification of Rabies Virus Nucleoprotein / D. Mahshid, R. Pooneh, Haghghat, S. et al. // *Jundishapur J Microbiol.* – 2014. – № 7 (9). – e11734.
140. Mani, R. S., Madhusudana S. N. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances / R. S. Mani, S. N. Madhusudana // *Scientific World Journal.* – 2013:569712.
141. Marks, M. S. Determination of molecular size by zonal sedimentation analysis on sucrose density gradients / M. S. Marks // *Curr Protoc Cell Biol.* – 2001. – Chapter 5:Unit 5.3.
142. Matouch, O. The rabies situation in Eastern Europe / O. Matouch // *Dev Biol (Basel).* – 2008. – № 131. – P. 27-35.
143. McGettigan, J. P. Second-Generation Rabies Virus-Based Vaccine Vectors Expressing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Have Greatly Reduced Pathogenicity but Are Highly Immunogenic / J. P. McGettigan, R. J. Pomerantz, C. A. Siler et al. // *J Virol.* – 2003. – V. 77, № 1. – P. 237–244.
144. Mebatsion, T. Frank Weiland, and Karl-Klaus Conzelmann. Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. / T. Mebatsion, F. Weiland, K. K. Conzelmann // *J Virol.* – 1999. – V. 73. – № 1. – P. 242–250.

145. Medeiros, R. Persistence of Rabies Virus-Neutralizing Antibodies after Vaccination of Rural Population following Vampire Bat Rabies Outbreak in Brazil / R. Medeiros, V. Jusot, G. Houillon et al. // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – V. 10, № 9. – e0004920.
146. Mehta, S. Use of rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for in vitro evaluation of anti-rabies activity / S. Mehta, S. Roy, A. Chowdhary // *Virus disease.* – 2017. – V. 28, № 2. – P. 127-132.
147. Mendonça, R. Z. Preparation of human rabies vaccine in VERO cell culture using a microcarrier system / R. Z. Mendonca, L. M. Ioshimoto, R. M. Mendonca et al. // *Braz J Med Biol Res.* – 1993. – V. 26, № 12. – P. 1305-1317.
148. Meslin, F. X. *Laboratory Techniques in Rabies.* 4th edition / F. X. Meslin, H. Koprowsky, M. M. Kaplan. – Geneva, Switzerland: World Health Organization. – 1996.
149. Muller, T. Elimination of terrestrial rabies in Germany using oral vaccination of foxes / T. Muller, H. J. Batza, C. Freuling // *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* – 2012. – V. 125, № 5-6. – P. 178-90.
150. Nagarajan, T. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture / T. Nagarajan // *Biologicals.* – 2006. – V. 34, № 1. – P. 21-27.
151. Nagaraj, T. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques / T. Nagarajan, J. P. Vasanth, A. Desai // *J Clin Virol.* – 2006. – V. 36, № 1. – P. 17-23.
152. Nakagawa, K. Molecular Function Analysis of Rabies Virus RNA Polymerase L Protein by Using an L Gene-Deficient Virus / K. Nakagawa, Y. Kobayashi, N. Ito et al. // *J Virol.* – 2017. – V. 9, № 20. – e00826-17.
153. Nakahara, T. Characterization of a slow-migrating component of the rabies virus matrix protein strongly associated with the viral glycoprotein / T. Nakahara, H. Toriumi, T. Irie et al. // *Microbiol Immunol.* – 2003. – V. 47, № 12. – P. 977-988.
154. Nasukawa, T. Virus purification by CsCl density gradient using general centrifugation / T. Nasukawa, J. Uchiyama, S. Taharaguchi et al. // *Arch Virol.* – 2017. – V. 162, № 11. – P. 3523-3528.

155. Neurath, A. R. Density gradient centrifugation studies on rabies virus / A. R. Neurath, T. J. Wiktor, H. Koprowski // *J Bacteriol.* – 1966. – V. 92, № 1. – P. 102-106.
156. Nigg, A. J. Overview, prevention, and treatment of rabies / A. J. Nigg, P. L. Walker // *Pharmacotherapy.* – 2009. – V. 10. – P. 1182-95.
157. Nishizono, A. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis / A. Nishizono, P. Khawplod, K. Ahmed et al. // *Microbiol Immunol.* – 2008. – Vol. 52 (4). – PP. 243-249.
158. O'Hern, P.A. Rapid desalting of ammonium sulfate solutions by hydrophobic interaction chromatography / P. A. O'Hern, E. Goldberg // *Protein Expr Purif.* – 1991. – V. 2, № 2. – P. 59-62.
159. Oliver, L. Microarray for Identification of the Chiropteran Host Species of Rabies Virus in Canada. / Lung Oliver et al // *Microarrays (Basel).* – 2013. – V. 2, № 2. – P. 153–169.
160. Park, S. R. Optimization of Ammonium Sulfate Concentration for Purification of Colorectal Cancer Vaccine Candidate Recombinant Protein GA733-FcK Isolated from Plants / S. R. Park, C. Y. Linn, D. S. Kim et al. // *Front Plant Sci.* – 2015. – 6:1040.
161. Paul T. Wingfield. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate / P. T. Wingfield // *Curr Protoc Protein Sci.* – 2001. – PMC4817497.
162. Pearce, J. Louis Pasteur and Rabies: a brief note. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psichiatry.* 2002 Jul; 73(1): 82.
163. Rabies vaccines. *Weekly epidemiological record*, № 49/50, 7 December, 2007 – 2007, №82. P.425–436.
164. Prabhu, K. N. Application and Comparative Evaluation of Fluorescent Antibody, Immunohistochemistry and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Tests for the Detection of Rabies Virus Antigen or Nucleic Acid in Brain Samples of Animals Suspected of Rabies in India / K. N. Prabhu, S. Isloor, B. H. Veeresh et al. // *Vet Sci.* – 2018. – V. 5, № 1. – P. 24.
165. Prem Kumar, A. A. Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column

- chromatography and zonal centrifuge purification / A. A. Prem Kumar, K. R. Mani, C. Palaniappan et al. // *Microbes Infect.* – 2005. – V. 7, № 9-10. – P. 1110-1116.
166. Ramya, R. Expression and Solubilization of Insect Cell-Based Rabies Virus Glycoprotein and Assessment of Its Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice / R. Ramya, B. M. Subramanian, V. Sivakumar // *Clin Vaccine Immunol.* – 2011. – V. 18, № 10. – P. 1673–1679.
167. Raux, H. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain / H. Raux, A. Flamand, D. Blondel // *J. Virol.* – 2000. – V. 74, № 21. – P. 10212–10216.
168. Ray, K. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1 / K. Ray, M. J. Embleton, B. L. Jaikhani et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2001. – V. 25, № 1. – P. 94–101.
169. Realegeno, S. An ELISA-based method for detection of rabies virus nucleoprotein-specific antibodies in human antemortem samples / Realegeno S., Niezgod M., Yager P. A. et al. // *PLoS One.* – 2018. – № 13 (11).
170. Reid-Sanden, F. L. Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus / F. L. Reid-Sanden, J. W. Sumner, J. S. Smith et al. // *J Clin Microbiol.* – 1990. – V. 28, № 5. – P. 858–863.
171. Rojjanaporn, P. The Glycoprotein and the Matrix Protein of Rabies Virus Affect Pathogenicity by Regulating Viral Replication and Facilitating Cell-to-Cell Spread / P. Rojjanaporn, J. Li, M. J. Schnell et al. // *J Virol.* – 2008. – V. 82, № 5. – P. 2330–2338.
172. Rowe, C. L. Nuclear Trafficking of the Rabies Virus Interferon Antagonist P-Protein Is Regulated by an Importin-Binding Nuclear Localization Sequence in the C-Terminal Domain / C. L. Rowe, K. M. Wagstaff, S. Oksayan et al. // *PLoS One.* – 2016. – V. 11, № 3. – e0150477.
173. Rudd, R. J. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus / R. J. Rudd, C. V. Trimarchi, M. K. Abelseth // *J Clin Microbiol.* – 1980. – V. 12, № 4. – P. 590–593.

174. Sabeta, C. T. Mokola Virus in Domestic Mammals, South Africa / C. T. Sabeta, W. Markotter, D. K. Mohale et al. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2007. – V. 13, № 9. – P. 1371–1373.
175. Sadkowska-Todys, M. Rabies in Poland in 2013 and 2014 / M. Sadkowska-Todys, B. Kucharczyk // *Przegl Epidemiol*. – 2016. – V. 70, № 3. – P. 399-406.
- 180.
176. Sasikalaveni, A. Co-culture: A quick approach for isolation of street rabies virus in murine neuroblastoma cells / A. Sasikalaveni, K. G. Tirumurugaan, S. Manoharan // *Vet World*. – 2015. – V. 8, № 5. – P. 636–639.
177. Schlottau, K. Development of molecular confirmation tools for swift and easy rabies diagnostics / K. Schlottau, C. M. Freuling, T. Muller et al. // *Virology Journal*. – 2017. – 14:184.
178. Schmidt, G. Densitometric analysis of Western blot (immunoblot) assays for human immunodeficiency virus antibodies and correlation with clinical status / G. Schmidt, K. Amiraian, H. Frey et al. // *J Clin Microbiol*. – 1987. – V. 25, № 10. – P. 1993–1998.
179. Schneider, L. G. Rabies group-specific ribonucleoprotein antigen and a test system for grouping and typing of rhabdoviruses / L. G. Schneider, B. Dietzhold, R. E. Dierks et al. // *J Virol*. – 1973. – V. 11, № 5. – P. 748-755.
180. Sharma, P. Comparison of immunochromatographic diagnostic test with Heminested Reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of rabies virus from brain samples of various species / P. Sharma, C. K. Singh, D. Narang et al. // *Vet World*. – 2015. – V. 8, № 2. – P. 135–138.
181. Shingler, K. L., Organtini L. J., Hafenstein S. Enterovirus 71 Virus Propagation and Purification / K. L. Shingler, L. J. Organtini, S. Hafenstein // *Bio Protoc*. – 2014. – V. 4, № 9. – e1117.
182. Singh, R. Rabies - epidemiology, pathogenesis, public health concerns and advances in diagnosis and control: a comprehensive review / R. Singh, K. P. Singh, S. Cherian et al. // *Vet Q*. – 2017. – № 37 (1). – P. 212-251.

183. Sokol, F. Structural Proteins of Rabies Virus / F. Sokol, D. Stancek, H. Koprowski // *J Virol.* – 1971. – V. 7, № 2. – P. 241–249.
184. Stein, L. T. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species / L. T. Stein, R. R. Rech, L. Harrison et al. // *Vet Pathol.* – 2010. – V. 47, № 4. – P. 630-633.
185. Sullivan, H. A. Concentration and purification of rabies viral and lentiviral vectors / H. A. Sullivan, I. R. Wickersham // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2015. – V. 4. – P. 386-391.
186. Sureau, P. Rabies vaccine production in animal cell cultures / P. Sureau // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* – 1987. – V. 34. – P. 111-128.
187. Takamatsu, F. Studies on the rabies virus RNA polymerase: 2. Possible relationships between the two forms of the non-catalytic subunit (P protein) / F. Takamatsu, N. Asakawa, K. Morimoto et al. // *Microbiol Immunol.* – 1998. – V. 42, № 11. – P. 761-771.
188. Tantawichien, T. Safety and immunogenicity of chromatographically purified Vero cell rabies vaccine for intradermal pre- and post-exposure rabies prophylaxis / T. Tantawichien, S. Sibunruang, J. Angsanakul // *Expert Rev Vaccines.* – 2014. – V. 13, № 12. – P. 1593-601.
189. Tekki, I. S. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies / I. S. Tekki, Z. N. Ponfa, C. I. Nwosuh // *African Health Sciences.* – 2016. – V. 16, № 1. – P. 123–127.
190. Toinon, A. Study of rabies virus by Differential Scanning Calorimetry / A. Toinon, F. Greco, N. Moreno et al. // *Biochem Biophys Rep.* – 2015. – V. 4. – P. 329–336.
191. Vázquez-Morón, S. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain / S. Vasquez-Moron, S. Juste, C. Ibanez et al. // *Emerging Infectious Diseases.* – 2011. – V. 17, № 3. – P. 520–523.
192. Vidy, A. Rabies Virus P Protein Interacts with STAT1 and Inhibits Interferon Signal Transduction Pathways / A. Vidy, M. Chelbi-Alix, D. Blondel // *J Virol.* – 2005. – V. 79, № 22. – PP. 14411–14420.

193. Wang, W. Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation / W. Wang, Q. J. Liu, H. Cui // *Electrophoresis*. – 2007. – V. 28, № 14. – P. 2358-2360.
194. Warner, C. K. Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and genome in situ in formalin-fixed tissues / C. K. Warner, S. G. Whitfried, M. Fekadu et al. // *Journal of Virological Methods*. – 1997. – V. 67, № 1. – P. 5–12.
195. Wasniewski, M. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores / M. Wasniewski, F. Cliquet // *J Virol Methods*. – 2012. – V. 179, № 1. – P. 166-175.
196. Webster, L. T. A mouse test for measuring the immunizing potency of antirabies vaccines / L. T. Webster // *J Exp Med*. – 1939. – V. 70, № 1. – P. 87–106.
197. Webster, L. T., Clow A. D., Bauer J. H. Experimental studies on encephalitis: III. Survival of encephalitis virus (St. Louis type) in anopheles quadrimaculatus / L. T. Webster, A. D. Clow, J. H. Bauer // *J Exp Med*. – 1935. – V. 61, № 4. – P. 479–487.
198. Warrell, M. J. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-third Edition)* / M. J. Warrell. – 2014. – 1360 p.
199. Wilde, H. Rabies in Asia: the classical zoonosis / H. Wilde, T. Hemachudha, S. Wacharapluesadee // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2013. – № 365. – P. 185-203.
200. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organization Technical Report Series. 2013; (982).
201. Yan, L. Expression and purification of rabies virus glycoprotein and analysis of its specific binding capacity to memory B cells / L. Yan, W. Gong, W. Zhu et al. // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. – 2017. – № 11. – P. 1840-1849.
202. Zhirnov, O. P. Isolation of matrix protein M1 from influenza viruses by acid-dependent extraction with nonionic detergent / O. P. Zhirnov // *Virology*. – 1992. – V. 186, № 1. – P. 324-330.
203. Zhenhai, C. A Novel Rabies Vaccine Based on a Recombinant Parainfluenza Virus 5 Expressing Rabies Virus Glycoprotein / C. Zhenhai, Z. Ming, X. Gao et al. // *J Virol*. – 2013. – V. 87, № 6. – P. 2986–2993.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблицы:

1. Концентрации белка (C_6) в антигенных фракциях, полученных на различных стадиях фракционирования (с. 55);
2. Активность и специфичность в ИФА антигенных фракций после разделения в градиенте сахарозы и очистки методом гель-фильтрации (с. 61);
3. Концентрация белка (C_6) в образцах, выделенных в процессе трёхфазной экстракции (с. 69);
4. Сравнительная характеристика схем гипериммунизации кроликов (с. 81);
5. Показатели оптической плотности сыворотки крови, полученной при иммунизации АГ ВБ (с. 82);
6. Активность суммарных кроличьих IgG в ИФА (с. 88);
7. Характеристика суммарных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с ФИТЦ (ФАГ) (с. 89);
8. Результаты исследования активности ФАГ в МФА (с. 90);
9. Результаты исследования высокоспецифичных антирабических иммуноглобулинов в «сэндвич»-ИФА (с. 95);
10. Результаты детекции АГ ВБ в пробах патологического материала в «сэндвич»-ИФА с иммуноглобулинами разной степени специфичности (с. 98);

Рисунки:

1. Белки, кодирующие геном вируса бешенства (с. 15);
2. Общая архитектура исследований (с. 50);
3. Микрофотография вириона ВБ в материале, полученном после первичного УЦФ (НК). Риска = 100 нм (с. 53);
4. Процесс разделения ВСМ в градиенте плотности сахарозы (с. 54);

5. Электрофореграмма, окрашивание по Кумасси (А) и вестерн-блоттинг на НЦМ (Б) вирусного материала, разделённого по плавучей плотности в ступенчатом градиенте сахарозы (с. 55);
6. Денситограмма с НЦМ фракции АГ № 3 (вирусного материала, отобранного с 20-30% зоны сахарозы) (с. 56);
7. Показатели ОП фракций антигена вируса бешенства в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в наименьшем разведении, ОЕ (с. 57);
8. Гистограмма фракционирования антигенсодержащего материала, отобранного по результатам вестерн-блоттинга после УЦФ в градиенте плотности сахарозы, полученного методом гель-фильтрации (с. 59);
9. Вестерн-блоттинг на НЦМ после гель-фильтрации с гипериммунной кроличьей сывороткой (с. 59);
10. Денситограмма вестерн-блота антигенной фракции № 5, полученной методом гель-фильтрации вирусного материала, отобранного с 20-30% зоны сахарозы (с. 60);
11. Показатели ОП хроматографически очищенного вирусного материала, отобранного с зоны 20-30% сахарозы (с. 62);
12. Фазовая система при экстракции (с. 64);
13. Рис. 13. Электрофореграмма компонентов фазовой экстракционной системы в 12,5% ПААГ после переноса материала на НЦМ (с. 65);
14. Денситограмма ВСМ, полученного после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т (с. 66);
15. Показатели ОП образцов ВСМ, полученных по результатам трёхфазной экстракции в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в рабочем разведении 1:2560 (с. 67);
16. Электрофореграмма, окрашивание по Кумасси (А) и азотнокислым серебром (Б), антигенсодержащего материала после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т, полученного в процессе осаждения (с. 70);

17. Электрофореграмма после переноса на НЦМ антигенсодержащего материала после трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т, полученного в процессе осаждения (с. 71);
18. Денситограмма антигенной фракции, полученной путём трёхкратного озвучивания на УЗДН-2Т и последующего осаждения этанолом (1:1) (с. 72);
19. Показатели ОП образцов ВСМ, полученных в результате переосаждения этанолом и НСА в реакциях с положительной и отрицательной сыворотками в рабочем разведении 1:2560, ОЕ (с. 73);
20. Показатели ОП этаноловой фракции, полученной в результате трёхфазного концентрирования и озвучивания на УЗДН-2Т (с. 74);
21. Сравнительная динамика антителогенеза (титры АТ в ИФА) при различных схемах иммунизации кроликов (с. 79);
22. Результаты вестерн-блоттинга с отдельными сыворотками крови, полученными в процессе гипериммунизации кроликов промышленной вакциной и высокоочищенным АГ ВБ, в разведении 1:1000 (с. 83);
23. Денситограммы сыворотки крови кроликов, отобранных по завершению циклов иммунизации (с. 84);
24. Оценка активности полученных ФАГ в МФА (разведение 1:32) на мазках-отпечатках головного мозга мышей, заражённых ВБ «Овечий» (ГНКИ) (с. 91).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение III

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ И
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ» (ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИИ») ¹

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «ФЦТРЕ-ВНИИ»

А.Н. Зюкитис
« 05 » _____ 2018 г.



Технологический регламент получения
высокоочищенного антигена производственного штамма
вируса бешенства «Овечий» ГНКИ

Казань – 2018

Научный руководитель:

зам. директора по НИР
и биобезопасности, д.б.н.



А.Н. Чернов

ответственные исполнители:

зав. отделом биобезопасности,
д.в.н., профессор



Х.Н. Макаев

д.б.н.



М. А. Ефимова

в.н.с., к.б.н.



К.С. Хаертънов

в.н.с., к.в.н.



Р.М. Ахмедов

м.н.с.




Г.С. Арутюнян

аспирант



А.Г. Мухамеджанова

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности
Федеральное государственное бюджетное
учреждение

 **Федеральный институт
промышленной собственности
(ФИПС)**

Бережковская наб., 30, стр. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-495) 248-60-15. Факс (8-495) 531-43-18

Форма N 91 ИЗ-2017
910

ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ", Степанову В.И.
2
Научный городок
г. Казань
420075

На № 110 от 04.02.2019
На № 2018144597/04(074418)
При перекладе прошам скопировать на номер заявки
Исходная регистрационная от 18.02.2019

УВЕДОМЛЕНИЕ

о положительном результате формальной экспертизы
заявки на изобретение

(21) Заявка № 2018144597/04(074418)

Дата поступления документов заявки 14.12.2018

(22) Дата подачи заявки 14.12.2018

(71) Заявитель(и) Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности"
(ФГБНУ "ФЦТРБ-ВНИВИ"), RU

(54) Название изобретения Способ получения антигена вируса бешенства для
серологической диагностики

1	ДПМ 12.02.2019	200112
---	----------------	--------



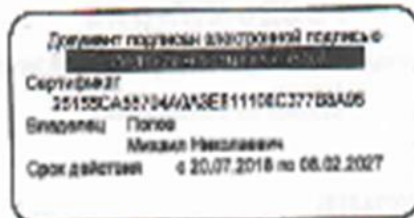
По результатам формальной экспертизы заявитель уведомляется о том, что формальная экспертиза заявки на изобретение, проведенная в соответствии со ст. 1384 Кодекса*, завершена с положительным результатом.

Дополнительно заявитель уведомляется о том, что:

- ходатайство о проведении экспертизы заявки по существу поступило 14.12.2018.

Результаты рассмотрения ходатайства будут сообщены дополнительно.

Государственный
эксперт по
интеллектуальной
собственности I
категории отдела
формальной экспертизы
заявок на изобретения
ФИПС



М. Н. Попов
8(495)531-65-63

*Информацию о состоянии деловых отношений вы можете узнать по телефону 8 (499) 346 60 15;

*Сведения о состоянии деловых отношений вы можете размещать на сайте ФИПС по адресу www.fips.ru в разделе «Информационный ресурс»/«Открытые ресурсы»;

*При изменении адреса для переписки необходимо сообщить об этом дополнительно.

*Гражданской кодекс Российской Федерации Часть четвертая от 18 декабря 2006 г. N 231-ФЗ с изменениями и дополнениями.

**Платежи о патентах и иных пошлинах за совершение юридически значимых действий, связанных с патентом на изобретение, пошлину за выданный патент, промисловый образец, с государственной регистрацией товарного знака и знака обслуживания, с государственной регистрацией и предоставлением исключительного права на использование места происхождения товара, а также с государственной регистрацией отчуждения исключительных прав на результаты интеллектуальной деятельности или средства индивидуализации, знака исключительного права, предоставленного права использования чужого результата или знака средства без согласия, утверждаются постановлением Правительства Российской Федерации от 20.12.2009 N 961 с изменениями.

***Административный регламент предоставления Федеральной службой по интеллектуальной собственности государственной услуги по государственной регистрации изобретения и выдачи патента на изобретение, его дубликата утвержден приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 года N 356, зарегистрирован 14.07.2016, регистрационный N 42843, с изменениями.

****Права на составление, выдачу и рассмотрение документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретения, в их форме утверждены приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 N 356, зарегистрирован 14.07.2016, регистрационный N 42843.

*****Требования к документам заявки на изобретение утверждены приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 N 356, зарегистрирован 14.07.2016, регистрационный N 42843.