

С.В. Грибенча, А.Ю. Козлов, Л.В. Костина, А.Л. Елаков, М.А. Лосич, В.В. Цибезов, А.Д. Забережный,
Т.И. Алипер

Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства

ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава России, 123098, Москва

Пять гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к нуклеопротеину вируса бешенства, были получены в результате слияния клеток селезенки мышей линии Balb/c с клетками мышиной миеломы SP2/0-Ag-14. В качестве антигена для иммунизации использован фиксированный вирус бешенства, штамм CVS. Установлено, что все гибридомы продуцировали антитела класса IgG. Все МКА в непрямом методе флуоресцирующих антител (НМФА), подобно американскому стандарту, окрашивали такие же внутриклеточные включения вируса бешенства в фиксированных ацетоном отпечатках ткани мозга мышей. Определено, что МКА 2e11 как в НМФА, так и меченные флуорохромом DyLight 488 в МФА по специфичности связывания с наиболее распространенными на территории России вирусами бешенства не уступают американскому стандарту.

Ключевые слова: вирус бешенства; нуклеопротеин; моноклональные антитела; метод флуоресцирующих антител

S. V. Gribencha, A. Yu. Kozlov, L. V. Kostina, A. L. Elakov, M. A. Losich, V. V. Tsibezov, A. D. Zaberezhny,
T. I. Aliper

Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein

D.I.Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Five hybridomas secreting monoclonal antibodies (MAbs) for the nucleocapsid protein of the rabies virus were obtained through the fusion of the SP2/0 murine myeloma cells with splenocytes of BALB/c mice immunized with fixed rabies virus (CVS strain). All hybridomas secrete MAbs of the IgG class that display different specificity to the nucleocapsids of rabies and rabies-related viruses. MAbs 2e11 showed the specificity for the prevalent in Russia rabies viruses that are similar to commercially available anti-rabies conjugate.

Key words: rabies virus; nucleoprotein; monoclonal antibodies; fluorescent antibody test.

Бешенство – одна из наиболее древних инфекций человека и животных. Вирус бешенства принадлежит к отряду *Mononegavirales* семейства *Rhabdoviridae*, род *Lyssavirus*. Данное острое нейровирусное заболевание передается со слюной человеку и теплокровным животным через укус плотоядных животных, зараженных в природе. Летальность достигает 100% [4, 6].

Глобальный характер распространения лиссавирусов, высокая патогенность для человека и животных, высокая летальность и отсутствие средств лечения развившегося заболевания выдвигают лиссавирусы на первое место среди всех рабдовирусов по их значимости для здоровья человека и животных. С точки зрения анализа последовательности нуклеотидов и аминокислот род *Lyssavirus* представляет собой наиболее гомогенную и отдаленную от других родов группу вирусов в составе филогенетического дерева *Rhabdoviridae* [6, 7].

Лиссавирусы являются единственными представителями рабдовирусов, которые поражают исключительно млекопитающих, а их репродукция в ЦНС – свидетельство высшей специализации не только среди семейства *Rhabdoviridae* [2, 11].

В настоящее время род *Lyssavirus* представлен 12 видами (генотипами). I вид – вирус бешенства, распространен повсеместно, за исключением Австралии и Антарктиды. II вид – вирус *Lagos bat* – Африка южнее Сахары. III вид – вирус *Mokola* – Африка южнее Сахары. IV вид – вирус *Duvenhage* – Африка южнее Сахары. V вид – лиссавирус европейских летучих мышей I-го

типа – Европа от Испании до Украины. VI вид – лиссавирус европейских летучих мышей 2-го типа – Северо-Западная Европа. VII вид – лиссавирус австралийских летучих мышей – Австралия. VIII вид – вирус *Khujiand* – Центральная Азия. IX вид – вирус *Aravan* – Центральная Азия. X вид – вирус *Иркут* – Восточная Сибирь. XI вид – вирус *Shimoni bat* – Кения. XII вид – вирус западно-кавказских летучих мышей – Юго-Восточная Европа [8, 10, 13].

Таким образом, из 12 лиссавирусов наиболее широкое распространение имеют вирусы бешенства (1-й генотип). Данные вирусы обозначаются как штаммы классического, уличного и дикого вируса бешенства, а также фиксированные (вакцинные) штаммы вируса бешенства. Вирусы бешенства широко распространены среди животных Европы, Азии, Северной и Южной Америки, а также Африки.

По данным ВОЗ, от бешенства в мире ежегодно умирают до 100 тыс. человек, причем эти данные отражают далеко не всю реальную картину смертности [2]. Ситуация по бешенству в России самая тяжелая среди развитых и большинства развивающихся стран. На протяжении 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность среди развитых стран [2].

По официальным данным Россельхознадзора, в России в 2011 г. заболело 3188 животных, в том числе 1539 диких, 1054 домашних плотоядных, 595 сельскохозяйственных [4]. По данным многолетних наблюдений, заболеваемость среди сельскохозяйственных животных держится на не-

Контактная информация:

Костина Людмила Владимировна, проф.; e-mail: lvkostina@mail.ru

изменном стабильном уровне, основной вклад в рост неблагополучия и заболеваемости вносят домашние и дикие плотоядные.

Среди лиссавирусов существует перекрестная антигенная связь на уровне нуклеопротеина. Уровень гомологии последовательностей аминокислот достигает 78–93%. Известно, что нуклеопротеин является важнейшим антигеном рабдовирусов, ответственным за стимуляцию Th-клеточного ответа [15]. Кроме того, в работе В. Dietzschold и соавт. показано, что на нуклеопротеине лиссавирусов находятся главные штаммо- и видоспецифические антигенные детерминанты [9]. Это позволяет создать общий диагностический для всех лиссавирусов на основе метода флюоресцирующих антител (МФА).

К золотому стандарту диагностики бешенства относятся два метода выделения вируса *in vivo* и *in vitro*, а также выявление нуклеопротеина вируса прямым методом флюоресцирующих моноклональных антител (МКА). В развитых и большинстве развивающихся стран для диагностики бешенства используют высокочувствительный и высокоспецифичный очень дорогой американский препарат FITC-Anti-Rabies Monoclonal Globulin (Fujirubio Diagnostics, Inc., США) на основе МКА [10, 14].

В России нет современной экспресс-диагностики бешенства, основанной на МКА, из-за чего большое сомнение вызывает достоверность результатов проводимых диагностических исследований [1, 2].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования заключалась в получении МКА к нуклеопротеину

вируса бешенства для создания российского препарата на основе МКА для диагностики бешенства, а также других лиссавирусных инфекций.

Материалы и методы

Вирусы. Использовали 19 лиссавирусов из коллекции лаборатории иммунологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (табл. 1). Данная группа вирусов включала 14 штаммов уличного вируса бешенства (см. табл. 1, № 1–14), 2 фиксированных штамма вируса бешенства (см. табл. 1, № 15 и 16), а также 3 лиссавируса G4, Юли (G5) – летучая мышь и G5 (см. табл. 1, № 17–19).

Животные. Использовали самок мышей линии BALB/c массой 18–20 г, а также беспородных белых мышей массой 8–9 г (питомник "Андреевка", ФГБУ НЦБио-медицинских технологий РАМН).

Иммуноген. В качестве иммуногена использовали фиксированный вирус бешенства, штамм CVS, полученный из США проф. М.А. Селимовым в 1964 г. Для приготовления антигена для иммунизации животных проводили внутримозговое заражение мышей линии Balb/c вирусом бешенства, штамм CVS (12 животных). На стадии клинического проявления бешенства (параличи, тремор, взъерошенность шерсти, судороги) мышей гуманным способом усыпляли эфиром, стерильно отбирали головной мозг, растирали его в фарфоровой ступке и готовили 10% суспензии мозга на среде ДМЕМ. Полученные суспензии центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин. Надосадочные жидкости отбирали и замораживали при -30°C.

Приготовление отпечатков мозга мышей для скрининга МКА проводили по методике [9, 14]. Беспородных белых мышей массой 8–9 г заражали интрацеребрально 13 лиссавирусами и на фазе клинических проявлений бешенства животных гуманным способом усыпляли эфиром и извлекали головной мозг в чашки Петри. Мозг мыши разрезали поперек, захватывая пинцетом его половинки, и прикладывали к поверхности предметного стекла, слегка надавливая до получения на стекле тонкого отпечатка. На одном стекле делали 6–8 отпечатков.

Иммунизация мышей и получение МКА. Для иммунизации использовали самок мышей линии BALB/c массой 18–20 г. Мозговую 10% суспензию вируса бешенства, штамм CVS, животным вводили внутрибрюшинно по 0,5 мл трехкратно на 0, 9 и 55-е сутки. Активность вируса при введении составила 10⁶ ТЦД 50 мкл/мл. Бустерную инъекцию проводили на 93-е сутки. Через 3 сут проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных животных с клетками мышины миеломы линии SP2/0-Ag-14. Для слияния использовали PEG/DMSO Solution (Sigma, США). Гибридизацию проводили по стандартному методу G. Kohler [12]. Через 12 дней выросшие в 96-луночных планшетах клоны тестировали методом непрямого МФА (НМФА). Положительные гибридомные клетки клонировали.

Для получения асцитов, содержащих МКА, самкам мышей линии BALB/c, предварительно обработанных пристаном (Sigma, США), вводили внутрибрюшинно по 5–10 млн гибридных клеток. Очистку МКА из асцитической жидкости проводили на протеин-G агарозе (Sigma, США). Концентрацию МКА после очистки измеряли на спектрофотометре при длине волны 280 нм.

Субкласс МКА, продуцируемых гибридомными клеточными линиями, определяли с помощью набора Mouse-Hybridoma-Subtyping Kit (Sigma, США).

Таблица 1

Использованные в работе лиссавирусы

№ п/п	Вирус	Вид	Место выделения	Источник выделения	Год выделения/получения
1	Волк	I	Сибирь	Волк	1992
2	Собака	I	Ленинградская область	Собака	1992
3	Лиса	I	Ленинградская область	Лиса	1989
4	Барсук	I	Псковская область,	Барсук	1992
5	Шувалов (кошка)	I	Центральная Россия	Человек	2002
6	Енотовидная собака	I	Новгородская область	Енотовидная собака	1982
7	Фролов (лиса)	I	Кустанай	Человек	1976
8	ЯК-ХБ (лиса)	I	Россия	Человек	1971
9	Д2	I	Ямал	Песец	1974
10	Д42	I	Ямал	Песец	1974
11	Д474	I	Якутия	Песец	1974
12	Д1125	I	Якутия	Песец	1974
13	Д1180	I	Якутия	Песец	1977
14	G1	I	Франция	Лиса	2010
15	Flugy НЕР (вирус фикс.)	I	США	Человек	1969
16	CVS (вирус фикс.)	I	США	Собака	1960
17	G4 – Дувенхейдж	IV	Южная Африка	Летучие мыши	2010
18	Юли (G5) – летучая мышь	V	Украина	Человек	1975
19	G5	V	Западная Европа	Летучие мыши	2010

Характеристика МКА к вирусу бешенства, штамм CVS

МКА	Изотип Ig	Активность МКА в НМФА (фиксированные отпечатки мозга мыши, ЯК-ХБ)	FAVN (CVS-11 1,8 Ig LD ₅₀ /мл)	НМФА	
				фиксированные отпечатки мозга мыши Вирус Денге (К-)	фиксированные отпечатки мозга незараженной мыши (К-)
2e1	IgG1	3+	0,17	0	0
2f1	IgG1	2-3+	0,17	0	0
2f7	IgG1	2-3+	0,17	0	0
2f9	IgG1	2-3+	0,17	0	0
2e11	IgG1	3-4+	0,17	0	0
МКА к N-белку, меченные ФИТЦ*, США (К+)	IgG2a	3-4+	0,17	0	0
Антитела к G-белку вируса бешенства, ВОЗ	Н.и.	Н.и.	1,49	Н.и.	Н.и.

Примечание. * – К+, МКА к N-белку, меченные ФИТЦ, использовали только в прямом МФА. Здесь и в табл. 4: Н.и. – не исследовано.

Конъюгирование МКА класса IgG с флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) проводили по методике [5, 10]. Конъюгирование МКА с флюорофором DyLight 488 осуществляли с помощью набора DyLight 488 Antibody Labeling Kit (Thermo-Fisher Scientific, США) по методике фирмы-изготовителя.

НМФА проводили согласно методике [8, 10].

В работе использовали антимышинные иммуноглобулины, меченные ФИТЦ, производства ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Окрашенные отпечатки просматривали в поле зрения люминесцентного инвертированного микроскопа Nikon TS100 (Япония).

Прямой МФА проводили согласно методике [8, 9].

На поверхность отпечатка наносили МКА к N-белку вируса бешенства, меченные ФИТЦ-МКА или флюорофором DyLight 488 (DL-МКА), в рабочем разведении 1:50. В качестве положительного контроля использовали американский стандарт – препарат FITC-Anti-Rabies Monoclonal Globulin на основе МКА, меченый ФИТЦ (Fujirebio Diagnostics, Inc., США).

Окрашенные отпечатки просматривали в поле зрения люминесцентного инвертированного микроскопа Nikon TS100 (Япония).

Реакцию нейтрализации с флюоресцирующими антителами (fluorescent antibody virus neutralisation, FAVN) проводили в культуре клеток ВНК-21 (клон 13) с использованием вируса бешенства, штамм CVS-11, согласно методике, рекомендованной МЭБ [3].

Электрофорез и иммуноблоттинг. Очищенный антиген вируса бешенства (штамм CVS) смешивали в соотношении 1:1 в лизирующем буфере (0,125 М трис-НСl, рН 6,8, 5% ДСН, 0,5% β-меркаптоэтанола, 10,8% глицерина, 0,01% бромфенолового синего) и прогревали 5 мин при 100°C. Электрофорез полученного материала проводили в пластинах 12% полиакриламидного геля размером 70 × 100 × 0,75 мм на приборе Mini-PROTEAN III (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 В. Белки в гелях окрашивали в течение 1 ч 0,1% раствором Кумасси ярко-голубого (СВВ R-350) в водном растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 45% метанола.

После электрофоретического разделения белки из геля переносили на ПВДФ-мембрану Immobilon-P (Millipore, США) на приборе Trans-Blot SD (Bio Rad, США) в буфере для электропереноса (0,025 М трис-НСl, 0,193 М глицин, 20% метанол, рН 8,35) при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны блокировали в растворе фосфатно-солевой буфер с твином-20 (ФСБТ), содержащем 3% Top Block (Yugo, Швейцария) в течение 16 ч при 4°C, высушивали на воздухе и хранили при 4°C.

Для иммунохимической детекции вирусных белков мембраны разрезали на полоски, соответствующие электрофоретическим трекам, и инкубировали с исследуемыми МКА (концентрация 50 мкг/мл в ФСБТ, содержащем 3% Top Block) в течение 1 ч при 37°C. Мембраны отмывали 4 раза в течение 15 мин ФСБТ, добавляли меченные пероксидазой антитела к IgG мыши (разведение 1:10 000 в ФСБТ, содержащем 3% Top Block) и инкуби-

ровали 1 ч при 37°C. После отмывания мембраны обрабатывали 3,3'-диаминобензидином (0,05% раствор в ФСБ с 0,01% H₂O₂).

Результаты и обсуждение

После бустерного введения вируса (штамм CVS) титр антител к нуклеопротеину вируса бешенства в гипериммунных сыворотках мышей в НМФА определили как 10⁻³. В ходе проведенной гибридизации получили 119 гибридных клеточных линий, устойчивых к селективной среде НАТ. При первичном тестировании культуральных жидкостей отобрали 17 гибридных клонов, продуцирующих МКА, которые специфически окрашивали внутриклеточные включения разной формы и размера в фиксированных ацетоном отпечатках ткани мозга мышей, зараженных вирусом ЯК-ХБ в реакции НМФА. С целью стабилизации культуральных свойств и специ-

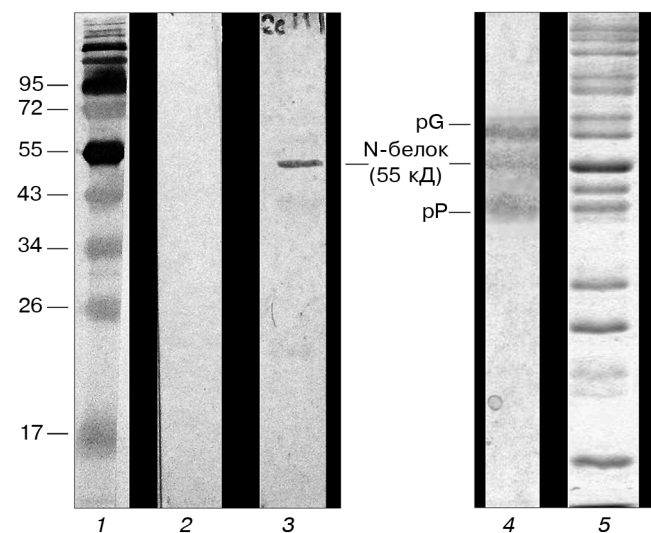


Рис. 1. Иммуноблоттинг с МКА 2e11 к N-белку вируса бешенства (Штамм CVS).

1, 5 – маркеры молекулярных весов; 2 – отрицательный контроль (МКА к N-белку вируса PRRS); 3 – МКА 2e11; 4 – очищенный вирус бешенства, электрофорез в 12% ПААГ. Результаты иммуноблоттинга с МКА 2e1, 2f1, 2f7 и 2f9 не представлены.

Таблица 3

Диапазон взаимодействия МКА с различными лиссавирусами в НМФА

№ п/п	Вирус	МКА					Американский стандарт (К+), МФА
		2f1	2e1	2f7	2a9	2e11	
1	ЯК-ХБ (лиса)	2-3+	3+	2-3+	2-3+	3-4+	3-4+
2	Шувалов (кошка)	3+	1-3+	2-3+	2-3+	3+	1-2+
3	Д1125	1+	1-2+	1+	1+	2-3+	1-3+
4	Д474	2+	1-2+	1-2+	1-2+	3+	3+
5	Барсук	0	0	1-2+	1+	3-4+	3-4+
6	Фролов (лиса)	0	2+	0	1+	1-2+	2+
7	Волк	0	0	0	1-2+	2-3+	3+
8	Собака	0	0	0	0	3-4+	3+
9	Лиса	0	0	0	0	1-2+	2-3+
10	G1	0	0	0	0	1-2+	2+
11	Fluя HEP (вирус фикс.)	0	0	0	0	2-3+	1-3+
12	G4 – Дувенхейдж	0	0	0	0	1-2+	1-3+
13	Юли (G5) –летучая мышь	0	0	0	0	2+	1+
14	G5	0	0	0	0	2+	1-2+
15	Д2	0	0	0	0	0	1+
16	Д42	0	0	0	0	0	1+
17	Енотовидная собака	0	0	0	0	0	1+
18	Вирус Денге (К-)	0	0	0	0	0	0
19	Отпечатки мозга незараженной мыши (К-)	0	0	0	0	0	0

фической секреции иммуноглобулинов провели двукратное клонирование гибридом методом предельных разведений. Большинство гибридных клеток оказались нестабильными по продукции МКА.

В результате клонирования отобрали 5 гибридом, стабильно продуцирующих МКА, специфически окрашивающих внутриклеточные включения вируса ЯК-ХБ, подобно американскому стандарту в НМФА.

Для того чтобы оценить перспективы использования полученных гибридом, провели первоначальную оценку МКА. Характеристики МКА представлены в табл. 2. Установили, что все гибридомы продуцировали антитела класса IgG. Все полученные МКА обладали высокой активностью в НМФА и демонстрировали четкую окраску внутриклеточных включений вируса бешенства, штамм ЯК-ХБ.

Все отобранные МКА в реакции нейтрализации FAVN в культуре клеток ВНК-21 не нейтрализовали (0,17 МЕ/мл) вирус бешенства, штамм CVS-11, тогда как антитела

к гликопротеину достоверно трехкратно превышали (1,49 МЕ/мл) минимально необходимый уровень (0,5 МЕ/мл) нейтрализации вируса. Исходя из данных реакции нейтрализации, можно предположить, что полученные нами МКА направлены не к гликопротеину вируса бешенства [3].

Показано, что все полученные МКА так же, как и американский стандарт (положительный контроль), не окрашивали фиксированные ацетоном отпечатки головного мозга мышей, зараженных неродственным вирусом Денге, а также отпечатки мозга не зараженных вирусом бешенства мышей (отрицательный контроль).

Как известно, американский стандарт представляет собой смесь двух МКА, меченных ФИТЦ и направленных к N-белку вируса бешенства, которые в фиксированных ацетоном отпечатках ткани головного мозга любого больного бешенством животного или человека специфично окрашивают нуклеопротеиновые внутриклеточные включения [10, 15].

Представленная выше информация, а также тот факт, что все полученные в работе МКА, подобно американскому стандарту, в НМФА окрашивают такие же внутриклеточные включения в фиксированных ацетоном отпечатках ткани мозга мышей, позволяют предположить, что полученные нами МКА специфически взаимодействуют с нуклеопротеином вируса бешенства, штамм ЯК-ХБ.

Точную идентификацию вирусного белка, с которым взаимодействовали полученные МКА, провели методом иммуноблоттинга (рис. 1). Все МКА давали специфическую полосу окрашивания в области 55 кД, что соответствует расчетной молекулярной массе N-белка вируса бешенства [2].

Таким образом, SDS-электрофорезом в денатурирующих условиях и иммуноблоттингом установлено, что МКА всех изученных клонов связываются с антигенными детерминантами, расположенными на N-белке вируса бешенства, что говорит о их высокой специфичности.

Для того чтобы оценить перспективы использования

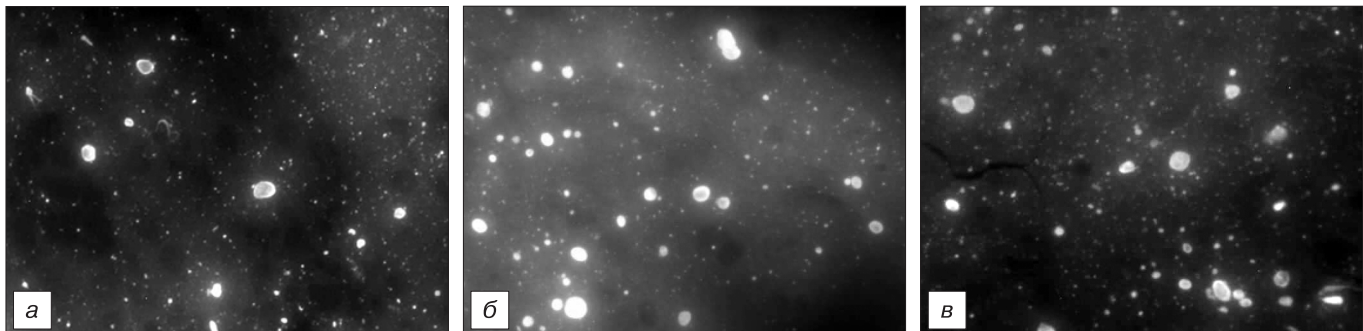


Рис. 2. Включение вируса бешенства (Шувалов-кошка) в отпечатках мозга мышей.

a – МФА, положительный контроль (Fujirebio, США) (ув. 1000); б – НМФА с МКА 2e11 (ув. 1000); в – МФА с МКА 2e11 (конъюгат 2e11-DyLight 488) (ув. 1000).

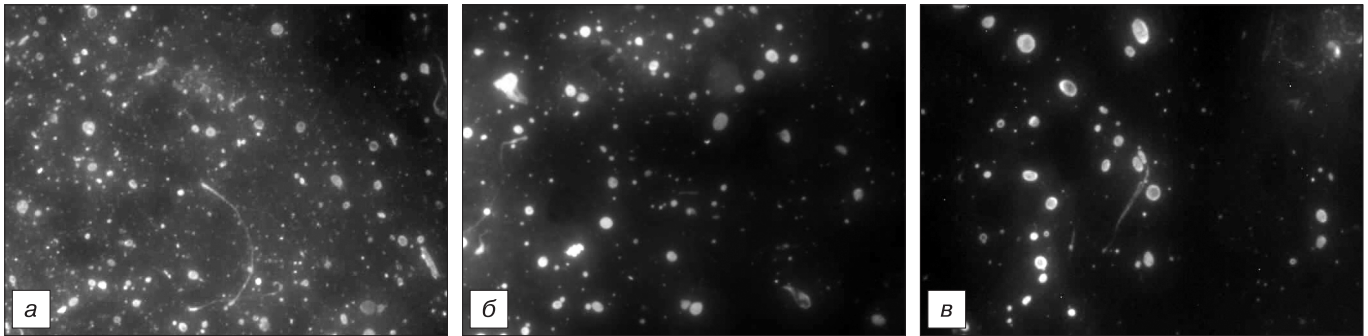


Рис. 3. Включения вируса бешенства (барсук) в отпечатках мозга мышей.

а – МФА, положительный контроль (Fujirebio, США) (ув. 1000); б – НМФА с МКА 2e11 (ув. 1000); в – МФА с МКА 2e11 (конъюгат 2e11 DyLight 488) (ув. 1000).

полученных МКА для создания диагностикума против бешенства, необходимо определить спектр их специфичности к циркулирующим в природе вирусам [14]. Уровень взаимодействия МКА с различными лиссавирусами изучали в НМФА в фиксированных ацетоном отпечатках головного мозга мышей, зараженных 17 лиссавирусами, в сравнении с американским стандартом. В качестве отрицательного контроля использовали фиксированные ацетоном отпечатки головного мозга мышей, зараженных неродственным вирусом Денге, а также отпечатки головного мозга не зараженной вирусом бешенства мыши. Результаты представлены в табл. 3.

Установили, что 4 МКА (2e1, 2f1, 2a9 и 2f7) реагируют с N-белком лишь нескольких штаммов вируса бешенства. Диапазон взаимодействия данных МКА с антигенными детерминантами N-белка варьирует от 4 до 7 вирусов бешенства. МКА 2e11 специфически взаимодействовали с 11 вирусами бешенства, циркулирующими на территории бывшего СССР и Франции, а также с 3 лиссавирусами: вид G4 (Дувенхейдж), циркулирующий на юге Африки; вид G5 – лиссавирус Европейских летучих мышей 1-го типа, циркулирующий в странах

Западной Европы; вирус "Юли" (G5), циркулирующий на территории Украины. Такое широкое взаимодействие МКА клона 2e11 с лиссавирусами позволяет предположить, что данные МКА распознают группоспецифические антигенные детерминанты на N-белке.

Следует отметить, что все полученные МКА не взаимодействовали с вирусом енотовидной собаки, циркулирующим на территории Центральной России, а также 2 вирусами Д2 и Д42, циркулирующими на севере России. В то же время при сравнительном анализе интенсивности свечения внутриклеточных включений 14 лиссавирусов, с которыми взаимодействовали МКА 2e11, установили, что данный показатель для МКА 2e11 по меньшей мере не уступает американскому стандарту (см табл. 3). Поэтому все дальнейшие исследования проводили с МКА 2e11. Данные МКА были наработаны в виде асцитических жидкостей, очищены с помощью аффинной хроматографии и сконцентрированы.

Представляло интерес сравнить специфичность связывания МКА 2e11 с N-белком вируса бешенства в прямом МФА и НМФА. Для этого препараты МКА 2e11 конъюгировали с ФИТЦ и DyLight 488 флюорохромами и протестировали с 14 лиссавирусами. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Специфичность связывания немеченных и меченных флюорохромами ФИТЦ и DyLight 488 МКА 2e11 с различными лиссавирусами в МФА

№ п/п	Вирус	К+ (американский стандарт) (рабочее разведение 1:50)	НМФА 2e11 (рабочее разведение 1:50)	МФА-ФИТЦ 2e11 (рабочее разведение 1:50)	МФА-DyLight 488 2e11 (рабочее разведение 1:50)
1	ЯК-ХБ (лиса)	3+	3-4+	1+	2+
2	Собака	2+	3-4+	2+	3+
3	Шувалов (кошка)	2+	3+	2+	2-3+
4	Лиса	2-3+	2-3+	1+	3+
5	Барсук	3+	3-4+	2+	3+
6	Д1125	2-3+	2-3+	1+	3+
7	Д474	1+	1-2+	1+	3+
8	Фролов (лиса)	2-3+	1-2+	1-2+	Н.и.
9	Волк	2-3+	2-3+	1+	1+
10	Енотовидная собака	1-2+	0	0	0
11	G1	1-2+	1-2+	1+	Н.и.
12	G4 – Дувенхейдж	2+	1-2+	0	0
13	Юли (G5) – летучая мышь	1+	1+	0	1+
14	G5	1-2+	1-2+	0	0

Примечание. Н.и. – не исследовано.

Установили, что специфичность связывания МКА 2e11 в НМФА с наиболее распространенными в России вирусами бешенства (ЯК-ХБ (лиса), Барсук, Шувалов (кошка) и Собака) превосходит препарат США (см. табл. 4, рис. 2, 3). Однако при конъюгировании МКА 2e11 с флюорохромами ФИТЦ и DyLight 488 происходило изменение специфичности связывания МКА с N-белком лиссавирусов. Интенсивность свечения МКА 2e11, конъюгированных с ФИТЦ, в большинстве случаев уступала как МКА 2e11, меченным флюорохромом DyLight 488, так и американскому стандарту. Возможно, при связывании используемых нами флюоресцентных меток с МКА несколько снижается способность МКА распознавать эпитоп нуклеопротеина вируса бешенства.

При сравнительном анализе интенсивности свечения МКА 2e11, меченных флюорохромами ФИТЦ и DyLight 488, видно, что меченные DyLight 488 МКА 2e11 превос-

ходят по специфичности ФИТЦ-конъюгат. Кроме того, специфичность связывания конъюгата DyLight 488 с 5 вирусами бешенства (Барсук, Шувалов (кошка), Собака, Д 1125, Д 474) превосходила или по крайней мере не уступала американскому аналогу. Эти данные свидетельствуют о перспективности конъюгата DyLight 488.

Таким образом, можно заключить, что МКА 2e11 как в НМФА, так и меченные флюорохромом DyLight 488 по специфичности связывания с наиболее распространенными на территории России вирусами бешенства не уступают американскому аналогу (стандарту).

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Ведыриков В.А., Гулюкин М.И., Рожественский И.К. и др., ред. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 г. М.; 2008. [Vedernikov V.A., Guljukin M.I., Rozhdestvenskij I.K. et al., red. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation in 2007, and I half-year 2008. Moscow; 2008] (in Russian).
2. Грибенча С.В., Львов Д.К. Рабдовирусы. В кн.: Львов Д.К., ред. Медицинская вирусология. М.: МИА; 2008: 586–94. [Gribencha S.V., L'vov D.K. Rhabdoviridae. V kn.: L'vov D.K., red. Medicinskaja virusologija. Moscow: MIA; 2008: 586–94] (in Russian).
3. Лосич М.А., Непоклонова И.В., Мухин А.Н., Раев С.А., Селиверстов А.С., Грибенча С.В. и др. Разработка и иммунологические свойства новой антирабической вакцины "Рабифел". Российский ветеринарный журнал. 2012; 2: 10–4. [Losich M.A., Nepoklonova I.V., Mukhin A.N., Raev S.A., Seliverstov A.S., Gribencha S.V. et al. The development and characterisation of the immunobiological properties of a new anti-rabic vaccine "Rabifel". Rossijskij veterinarnyj zhurnal. 2012; 2: 10–4] (in Russian).
4. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. Бешенство животных в России в 2007–2011 гг. Российский ветеринарный журнал. 2012; 6: 8–12. [Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. Rabies

animals in Russia in 2007–2011. Rossijskij veterinarnyj zhurnal. 2012; 6: 8–12] (in Russian).

5. Amante L., Ancona A., Forni L. The conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate. A comparison between the amorphous and the crystalline fluorochrome. J. Immunol. Methods. 1972; 1(3): 289–301.
6. Badran H., Bahloul C., Perrin P., Tordo N. Evidence of two lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. J. Virol. 2001; 75: 3268–76.
7. Bourhy H., Kissi B., Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. Virology. 1993; 194: 70–81.
8. Botvinkina A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P. et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9: 1623–5.
9. Dietzschold B., Rupprecht C.E., Tollis M., Lafon M., Mattei J., Wiktor T. et al. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. Rev. Infect. Dis. 1988; 10(4): S 785–98.
10. Flamand A., Wiktor T.J., Koprowski H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic difference between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. 1980; 48: 97–104.
11. Fu Z.F. Genetic comparison of rhabdoviruses from animals and plants. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2005; 292: 1–24.
12. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256: 495–7.
13. Kuzmin I.V., Wu X., Tordo N., Rupprecht C.E. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. Virus Res. 2008; 136: 81–90.
14. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO Technical Report Series. 2004; 931: 18.
15. Yan J., Yonghuang L., Frank M. Characterization of conformation-specific monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. Arch. Virol. 2010; 155(8): 1187–92.

Поступила 21.03.13

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.915-078.33

Т.А. Мамаева¹, М.А. Наумова¹, Н.В. Железнова², Г.Ю. Лунская³, М. Mulders⁴, D.A. Featherstone⁴

Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью

¹ФБУН "Московский НИИЭМ им. Г.Н. Габричевского", 252212, Москва; ²ФБУН "Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера", 197101, Санкт-Петербург; ³НИИФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, 199899, Москва; ⁴ВОЗ, Женева, Швейцария

Оценены чувствительность и оперативные характеристики девяти коммерческих тест-систем (иммуноферментный анализ – ИФА) для определения уровня специфических IgM и IgG разного формата: indirect и capture. Материалом исследования стали 72 сыворотки больных типичной среднетяжелой формой кори из очага инфекции (2010), полученные на 5–6-е сутки после появления сыпи. Установлено, что с помощью тестов формата capture (VectoMeasles IgM, Vector-Best; Measles IgM capture EIA, Microimmune Ltd) IgM определялись практически в 100% случаев независимо от возраста и исходного вакцинального статуса больного, тогда как при использовании тестов формата indirect (IgEnzygnost® Anti-Measles Virus/IgM Siemens, Anti-Measles Viruses ELISA IgM Euroimmun, Virion-Serion IgM GmbH) результат был отрицательным в среднем у 23,6% взрослых, большинство которых имели 1–2 прививки в прошлом. Достоверность анализа показателей OD IgM и IgG, полученных при исследовании сывороток у больных с первичным и вторичным иммунным ответом разными тестами, высокая и не зависит от формата изученных тест-систем, о чем свидетельствуют значения F-критерия.

Ключевые слова: корь; специфические антитела; иммунитет; тест-системы; ИФА-метод.