Литература

1. А.В. Васильев, В.М. Колышкин, А.Л. Елаков. РНГА для выявления антител к вирусу чумы плотоядных // Ветеринария. 1996. № 11. С. 20–23.
2. Д.И. Реутская. Парвовирусный энтерит собак (Эпизоотология, иммунология, профилактика и меры борьбы): автореф. дис. … канд. вет. наук. Барнаул, 2003. 18 с.
3. В.Н. Сазонкин, В.И. Уласов, И.А. Домский. Оценка антигенности и иммуногенности вакцин против чумы плотоядных // Сб. науч. тр. ВГНКИ. М., 2005. Т. 66. С. 89–93.
4. Б.Ф. Шуляк. Вирусные инфекции собак. М.: Олита, 2004. 568 с.
5. M.J.G. Appel, B.A. Summers. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores // Vet. Microbiol. 1995. V. 44. P. 187–191.

УДК 619:578.824.11:616-097

А.В. Молодкин, С.Г. Аббасова[1], Н.А. Назаров, Н.В. Балохина[1], В.С. Васильева[1], Х.М. Бозиев[1], Ф.А. Бровко[1], К.Н. Груздев, С.С. Рыбаков

([1]Филиал института биоорганической химии РАН, г. Пущино Московской области)

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА

Введение

Бешенство — остро протекающая вирусная болезнь теплокровных животных и человека, характеризующаяся поражением центральной нервной системы и, как правило, неизбежной летальностью. Несмотря на предпринимаемые усилия по вакцинации основных хозяев вируса - домашних и диких плотоядных животных, для многих стран бешенство остается серьезной проблемой, в том числе и для Российской Федерации, представляя не только угрозу здоровью людей, но и нанося значительный экономический ущерб. В связи с этим во всем мире продолжаются интенсивные исследования по совершенствованию средств и методов диагностики бешенства.

Наиболее распространенными инструментами диагностики бешенства являются препараты на основе поликлональных и моноклональных антител, специфичных к вирусу бешенства. В настоящее время в нашей стране существуют диагностические наборы только на основе поликлональных антител. Эти наборы позволяют достаточно надежно диагностировать данное заболевание, но при этом имеют ряд недостатков, к числу которых в первую очередь относится перекрестная иммунореактивность, а также различия в качестве препаратов антирабических антител в зависимости от условий их получения. Поэтому разработка диагностикумов на основе моноклональных антител (МАт) является перспективным направлением. Основными преимуществами таких диагностикумов являются их высокая специфичность и возможность четкой стандартизации диагностических препаратов, что может значительно снизить уровень ложнопозитивных реакций. Надо учитывать, что для диагностических целей могут быть использованы только МАт к высококонсервативным участкам антигена вируса бешенства.

Моноклональные антитела также могут служить прекрасными инструментами для изучения антигенного разнообразия вируса бешенства и его эволюционного развития (15). Несмотря на то, что антигенные свойства вируса бешенства достаточно хорошо изучены, продолжает появляться информация о получении МАт к различным эпитопам структурных белков вируса [12].

В РФ в разное время проводились работы по получению моноклональных антител к разным белкам вируса бешенства [1, 3, 4, 5]. Однако антигенное разнообразие вируса бешенства, циркулирующего на территории страны, изучено недостаточно, что вызывает необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении. Подтверждением необходимости исследования эволюционного развития вируса бешенства на территории России является факт обнаружения у диких животных в северо-западном регионе страны (Псковская, Курская, Тверская области) вируса, имеющего антигенное родство с вирусом арктического бешенства [11].

Поскольку в последнее время во многих странах для профилактики бешенства, в том числе и в России, используются жи-

вые вакцины из аттенуированных штаммов, является актуальным получение моноклональных антител, с помощью которых можно дифференцировать полевые изоляты вируса бешенства от его вакцинных штаммов.

В связи с изложенным выше, нами была предпринята попытка получить и охарактеризовать моноклональные антитела к основным белкам культурального вируса бешенства вакцинного штамма ВНИИЗЖ, результаты которой приведены в данной статье.

Материалы и методы

Антигены. Вакцинный штамм вируса бешенства (ВБ ВНИИЗЖ) очищали и концентрировали по описанной ранее методике [6] из культурального вирусного сырья, инактивированного димером этиленимина.

Рибонуклеопротеин вируса бешенства (РНП ВБ) выделяли из клеток ВНК-21, инфицированных ВБ ВНИИЗЖ, по методике, рекомендованной ВОЗ в руководстве «Лабораторная диагностика бешенства» [13]. Концентрацию белка в очищенных препаратах определяли по Lowry O.H. [14].

Гликопротеин ВБ (G-белок) получали дезинтеграцией очищенного ВБ ВНИИЗЖ с помощью 2% тритона Х 100 в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем дезинтегрированный препарат вируса подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности хлористого цезия 1,16–1,36 г/см^3 в течение 2 ч при 70000 g. Отбирали верхний слой градиента, с содержащимся в нем G-белком, и диализовали против PBS. К полученному препарату G-белка добавляли очищенные поликлональные антитела против РНП ВБ [2] для удаления остаточных количеств РНП. Образовавшийся комплекс антитело-РНП удаляли с помощью белокА-сефарозы.

Иммунизация. 5-недельных самок мышей линии BALB/c иммунизировали ВБ ВНИИЗЖ по следующей схеме: 1-й день – внутримышечно в область тазобедренного сустава в дозе 30–40 мкг антигена на мышь с полным адъювантом Фрейнда; 45-й день — внутрибрюшинно с неполным адъювантом Фрейнда в дозе 50–60 мкг вируса на мышь; 61-й день — проводили внутрибрюшинное бустерное введение антигена в физиологическом растворе в дозе 20–30 мкг на мышь. На 64-й день проводили проверку титра антител в сыворотках крови мышей методом твердофазного ИФА в отношении ВБ ВНИИЗЖ.

Получение моноклональных антител. Гибридные клетки, продуцирующие моноклональные антитела против антигенов вируса бешенства, получали по стандартной методике [9]. Спленоциты иммунных мышей гибридизовали с мышиной миеломой NSO/1, полученной из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, с помощью раствора полиэтиленгликоля (Sigma). Гибридные клетки выращивали в питательной среде DMEM (Gibco), содержащей НАТ и 20% FCS (Gibco), а затем методом твердофазного ИФА отбирали клетки, специфичные в отношении РНП ВБ и G-белка. Одиночные клоны получали методом лимитирующих разведений. Для препаративной наработки моноклональных антител специфичные клоны гибридом наращивали и вводили интраперитонеально мышам линии BALB/c, предварительно получившим инъекцию пристана (Sigma).

Отбор гибридом, специфичных в отношении РНП и G-белка ВБ ВНИИЗЖ методом ИФА. Отбор гибридом, специфичных в отношении РНП и G-белка ВБ ВНИИЗЖ, проводили методом твердофазного ИФА. Для этого антигены сорбировали на 96-луночные ИФА-планшеты (Costar) в 0,05М карбонатном буфере (рН 9,5) при +4° С в течение ночи (1 мкг/мл, 50 мкл на лунку). Остаточные центры связывания пластика блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 40 мин при комнатной температуре. После этого в лунки ИФА-планшета добавляли культуральную жидкость гибридом и инкубировали в течение 1,5 ч при +37° С. Далее ИФА-планшеты отмывали 6 раз раствором PBS, содержащим 0,1% Tween 20 (Sigma) (PBST), и добавляли раствор поликлональных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали 40 мин при +37°С, отмывали и добавляли 4 мМ раствор о-фенилендиамина, содержащий 0,004% H_2O_2 в 0,05М цитрат-фосфатном буфере (рН 5.0). Инкубировали 20–25 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 10% серной кислотой и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Titertek®Multiscan при длине волны 492 нм.

Выделение моноклональных антител из асцитной жидкости мышей. Моноклональные антитела из асцитной жидкости мышей линии BALB/c преципитировали добавлением равного объема насыщенного сульфата аммония. Преципитированные антитела осаждали центрифугирова-

нием в течение 30 мин при 2000 g. Антитела выделяли на белокА-сефарозе [8]. Для этого осадок антител растворяли в 0,1М боратном буфере (pH 8,9), содержащем 3М NaCl и наносили на колонку с белокА-сефарозой. Антитела с колонки элюировали 0,2М раствором глицина (pH 3,5) и нейтрализовали 1М Tris-HCl (pH 8.0). Степень гомогенности иммуноглобулинов в препаратах определяли электрофоретическим методом по Laemlii [10]. Наиболее чистые фракции антител объединяли и использовали в дальнейшей работе.

Определение типов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Типы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов определяли методом твердофазного ИФА с помощью набора для типирования мышиных МАт (Amersham) согласно прилагаемой инструкции.

Определение констант аффинности моноклональных антител. Константы аффинности моноклональных антител определяли твердофазным ИФА по Beatty et al. [7]. Для этого РНП или G-белок ВБ, содержащиеся в 0,05М карбонатном буфере (pH 9,6) в концентрациях 1 и 0,5 мкг/мл, соответственно, вносили в объеме 50 мкл на лунку. Остаточные центры связывания пластика блокировали 1% БСА 40 мин при комнатной температуре, а затем в лунки планшета вносили моноклональные антитела в последовательных двукратных разведениях от 10 мкг/мл до 0,01мкг/мл по 50 мкл на лунку. После инкубации ИФА-планшеты отмывали раствором PBST и инкубировали с поликлональными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:500 в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем планшеты отмывали и добавляли 4 мМ раствор о-фенилендиамина, содержащий 0,004% H_2O_2 в 0,05М цитрат-фосфатном буфере (pH 5,0). Инкубировали 20–25 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 10% серной кислотой и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Titertek®Multiscan при длине волны 492 нм.

По данным, полученным в ИФА, строили график зависимости оптической плотности от концентрации антител при разных концентрациях антигена. Константы аффинности антител вычисляли по формуле:

$$K_a = \frac{n-1}{m(n[Ab]`-[Ab])},$$

где m — количество центров связывания антигена молекулы иммуноглобулина; n- соотношение концентраций антигена, [Ab]' — молярная концентрация антител, соответствующая 1/2 от полного насыщения МАт при минимальной концентрации антигена; [Ab] — молярная концентрация антител, соответствующая 1/2 от полного насыщения МАт при максимальной концентрации антигена

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили на культуре клеток ВНК-21. В качестве стандарта использовали культуральный ВБ ВНИИЗЖ. Реакцию проводили в 96-луночных культуральных планшетах. Результаты реакции учитывали по наличию или отсутствию флуоресценции после добавления антирабических антител, меченных флуоресцеинизотиоцианатом [16].

Реакция непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ). Фиксированные в ацетоне отпечатки мозга животных, павших от бешенства, обрабатывали моноклональными антителами в PBS в концентрации 0,29 мг/мл и 0,029 мг/мл. После инкубации в течение 30 мин при +37° С и последующего отмывания PBS дистиллированной водой к препаратам добавляли антимышиные иммуноглобулины, меченные флуороизотиоцианатом (ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва) в рабочем разведении, рекомендованном производителем. После инкубации в течение 30 мин при +37° С препараты отмывали, высушивали и оценивали флуоресценцию с помощью флуоресцентного микроскопа.

Непрямой сэндвич-вариант ИФА. В качестве первых антител использовали кроличьи поликлональные антитела, полученные на целый ВБ ВНИИЗЖ. Антитела сорбировали на 96-луночные ИФА-планшеты (Nunc) в 0,05М карбонатном буфере (pH 9,5) при +4° С в течение ночи (5 мкг/мл, 100 мкл на лунку). По окончании инкубации ИФА-планшеты 6 раз отмывали раствором PBST, остаточные центры связывания блокировали 10% раствором неиммунной сыворотки лошади в PBST. Антиген (разные штаммы ВБ и его полевые изоляты) наносили в цельном виде или в разведении с двукратным шагом в PBST и инкубировали в течение часа при +37° С. Далее ИФА-планшеты отмывали и наносили моноклональные антитела в разных разведениях в PBST или поликлональные антирабические антитела морской свинки в рабочем разведении и инкубировали в течение часа при +37° С. После отмывок добавляли раствор кроличьих поликлональных антител, полученных против иммуноглобули-

нов мыши и конъюгированных с пероксидазой хрена, в разведении 1:4000 (ФИБХ, г. Пущино) и инкубировали 60 мин при +37° С. После отмывания ИФА-планшетов добавление субстрата, остановку и учет результатов реакции проводили, как описано выше.

Штаммы и изоляты вируса бешенства. Для изучения антигенной специфичности моноклональных антител в непрямом сэндвич-варианте ИФА использовали следующие штаммы и изоляты вируса бешенства: культуральные штаммы — ВНИИЗЖ (III), РВ-97(III), ТС-80 (V), мозговой штамм — CVS-K+ (III), полевые изоляты — 496 (IV), 473 (IV), 634 (III). В скобках указаны антигенные варианты по Метлину А.Е. (11). Перед использованием в ИФА суспензию культуральных штаммов осветляли при 1500 g в течение 10 мин. Из мозговых штаммов готовили 20 % суспензию в PBS, подвергали однократному замораживанию-оттаиванию и осветляли при 1500 g в течение 10 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 20% осветленную суспензию мозга, полученную от неинфицированного кролика.

Результаты и обсуждение

Для получения большего количества специфичных гибридом и их точного скрининга важно было иммунизировать мышей наиболее очищенными антигенами вируса бешенства. Поэтому при выборе и разработке методов получения очищенных и концентрированных препаратов вирусных антигенов в первую очередь учитывали этот момент. Степень очистки антигенов вируса бешенства оценивали методом электрофореза в ПААГ с ДСН в денатурирующих условиях (рис. 1).

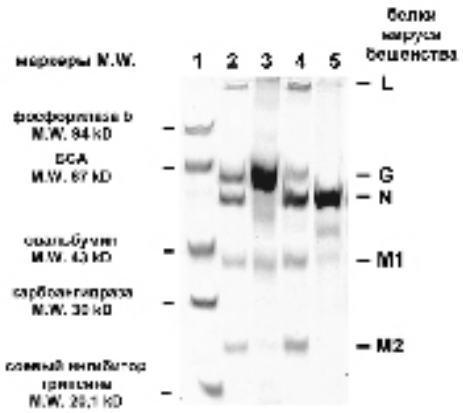

Рисунок 1. Электрофорез препаратов очищенных антигенов ВБ.
Дорожки: 1 — маркеры; 2 — целый ВБ; 3 — гликопротеин, выделенный из очищенного ВБ; 4 — РНП, выделенный из очищенного ВБ; 5 — РНП, выделенный из клеток ВНК-21, инфицированных ВБ

Как видно из рис. 1 препарат целого вируса бешенства, его использовали для иммунизации мышей, содержал только вирусные белки (дорожка 2). Препараты гликопротеина и внутриклеточного рибонуклеопротеина вируса бешенства (дорожки 3 и 5) использовали для скрининга гибридом, специфичных к G-белку и РНП ВБ.

Всего вирусом бешенства ВНИИЗЖ было иммунизировано 5 мышей линии BALB/c. В результате иммунизации титр антирабических антител в сыворотках крови составил в непрямом варианте ИФА 1:51200–1:102400. У мышей были извлечены селезенки и приготовлены суспензии спленоцитов. Часть клеточной суспензии была использована для проведения гибридизации с мышиной миеломой линии NSO/1, а остальная часть спленоцитов в криосреде была заложена на хранение в жидкий азот.

Было проведено две гибридизации. В результате скрининга гибридом методом непрямого ИФА было отобрано и исследовано 30 продуцентов моноклональных антител, специфичных к антигенам вируса бешенства. Из них 16 вырабатывали антитела, специфичные к гликопротеину, а 14 — к рибонуклеопротеину вируса бешенства.

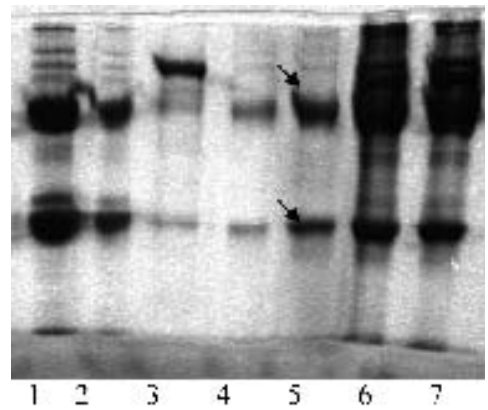

Рисунок 2. Электрофореграмма препаратов моноклональных антител ВНИИЗЖ N-1 в 10% ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии 2-меркаптоэтанола.
1 — препарат антител, очищенных на белокА-сефарозе(80 мкг на дорожку). 2 — препарат антител, очищенных на белокА-сефарозе (20 мкг на дорожку). 3, 4, 5 — препараты различных фракций, полученных в процессе хроматографии. 6, 7 — препараты антител после фракционирования 50% насыщенным сульфатом аммония. Стрелками указаны тяжелая (верхняя) и легкая (нижняя) цепи антител

Большая часть гибридом и клонов оказались слабоаффинными или в процессе культивирования и клонирования утратили способность вырабатывать антитела, поэтому в дальнейшей работе не использовались.

В результате реклонирования наиболее активных в ИФА клонов и специфичных к антигенам вируса бешенства, были отобраны 4 стабильных клона, продуцирующих высокие титры специфичных антител. Моноклональные антитела были наработаны в асцитной жидкости мышей линии BALB/c и выделены на белокА-сефарозе. Содержание иммуноглобулинов в препаратах моноклональных антител до и после аффинной хроматографии определяли с помощью электрофореза по Laemlii в денатурирующих и восстанавливающих условиях (рис. 2). Наиболее чистые фракции антител (дорожки 4 и 5) объединяли и использовали в дальнейшей работе.

У выделенных антител были определены константы аффинности и типы тяжелых и легких цепей. Константы аффинности определяли по методу Beatty [7]. На рис. 3 представлены кривые титрования клона ВНИИЗЖ N-1 с разными концентрациями РНП ВБ.

Для каждой кривой титрования определяли концентрацию МАт в точке, соответствующей 50% от полного насыщения (см. пунктирные линии на рис. 3). Полученные значения подставляли в формулу для определения констант аффинности. Кривые титрования остальных отобранных клонов со специфичными антигенами выглядели аналогичным образом. Характеристика отобранных клонов, а также их активность и специфичность в непрямом ИФА представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, специфичностью к G-белку обладали клоны: ВНИИЗЖ/G-1, ВНИИЗЖ/G-2, ВНИИЗЖ/G-3. Клон ВНИИЗЖ/N-1 был специфичен к РНП ВБ. Все полученные антитела имели IgG1 (к) типы тяжелых и легких цепей. Наибольшей константой аффинности обладали антитела ВНИИЗЖ/G-1 и ВНИИЗЖ/N-1.

Важным этапом настоящей работы явилось изучение вируснейтрализующей активности клонов, специфичных к гликопротеину вируса бешенства, в реакции нейтрализации на культуре клеток ВНК-21. Из трех G-специфичных гибридом вируснейтрализующей способностью обладал только клон ВНИИЗЖ/G-1 с титром 1:8.

Изучали иммунореактивность моноклональных антител с целью определения возможности использования отобранных клонов для антигенной дифференциации штаммов и полевых изолятов вируса бешенства в непрямом сэндвич-варианте ИФА. Результаты исследования МАт ВНИИЗЖ/G-2 представлены на рис. 4.

Как видно из рис. 4 антитела ВНИИЗЖ/G-2 в концентрации 80 мкг/мл реагировали с ВБ ВНИИЗЖ и очень слабо с некоторыми полевыми изолятами.

Антитела ВНИИЗЖ/G-3 приблизительно с одинаково невысокой активностью взаимодействовали со всеми образцами ВБ (штамм ТС-80 в реакции не исполь-

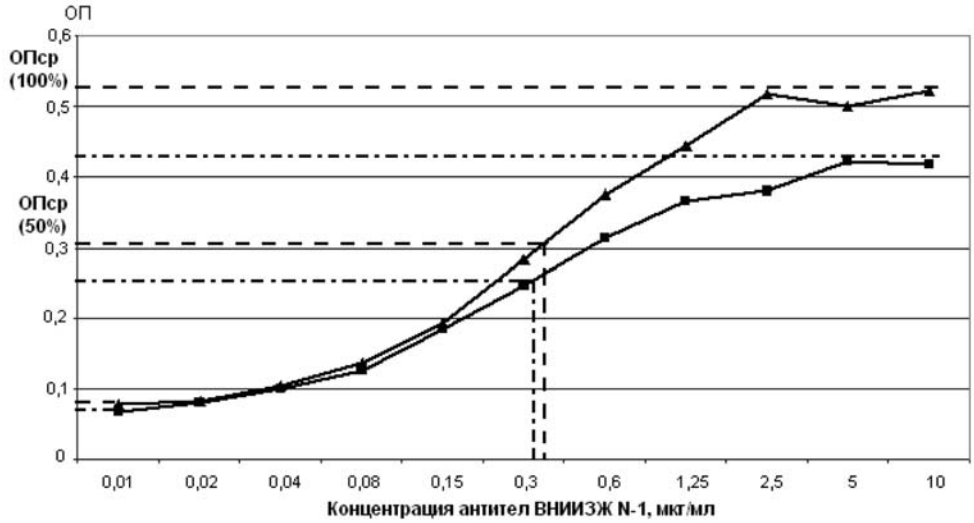

Рисунок 3. Кривые титрования моноклональных антител ВНИИЗЖ N-1.
■ — кривая титрования антител с РНП ВБ с концентрацией 0,5 мкг/мл.
▲ — кривая титрования антител с РНП ВБ с концентрацией 1,0 мкг/мл

Таблица 1

Характеристика, активность и специфичность асцитных моноклональных антител к РНП и G-белку ВБ ВНИИЗЖ

Название антител	Специфичность к белкам ВБ	Типы тяжелых и легких цепей	Константа аффинности, M^{-1}	Титр, мкг/мл*		Разведение МАт, соответствующее титру	
				РНП	G-белок	РНП	G-белок
ВНИИЗЖ/G-1	G-белок	IgG1 (к)	$2x10^9$	—	0,3	—	1:8640
ВНИИЗЖ/G-2	G-белок	IgG1 (к)	$3x10^8$	—	0,039	—	1:23040
ВНИИЗЖ/G-3	G-белок	IgG1 (к)	$5x10^8$	—	0,02	—	1:243850
ВНИИЗЖ/N-1	N-белок	IgG1 (к)	$1,3x10^9$	0,03	—	1:79279	—

* — титром считали наименьшую концентрацию антител, при которой величина оптического сигнала в 2 раза превышала среднюю величину оптического сигнала отрицательного контроля

зовали).

Антитела клона ВНИИЗЖ/G-1 были специфичны только в отношении ВБ ВНИИЗЖ (рис. 5).

В большинстве стран, неблагополучных по бешенству, для искоренения этого заболевания применяют вакцинацию диких плотоядных животных живыми вакцинами из аттенуированных штаммов ВБ. В РФ также используется метод оральной вакцинации. Поскольку при этом используются живые вакцины, то возникает необходимость дифференцировать вакцинные штаммы и полевые изоляты вируса бешенства. В связи с этим была изучена иммунореактивность моноклональных антител ВНИИЗЖ/G-1, специфичных к культуральному штамму ВНИИЗЖ, используемому при производстве инактивированной вакцины, в отношении культурального штамма РВ-97, на основе которого готовится живая вакцина. Результаты этих исследований представлены на рис. 6 и 7.

Как видно из рис. 6 и 7, данные антитела с одинаковой активностью и специфичностью реагировали с вирусом бешенства обоих штаммов. Полученные результаты позволяют сделать предположение о возможности использования антител ВНИИЗЖ/G-1 для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства ВНИИЗЖ и РВ-97. Для выяснения этого вопроса необходимы дополнительные исследования.

Все полученные МАт исследовали в реакции непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ) для изучения их способности выявлять внутриклеточные тельца включения (скопления РНП ВБ). В экспериментах с МАт, специфичными к гликопротеи-

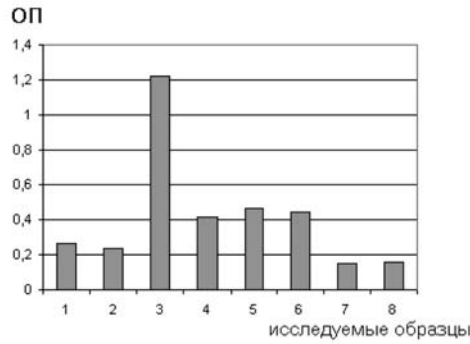

Рисунок 4. Иммунореактивность моноклональных антител ВНИИЗЖ/G-2 с разными антигенными вариантами ВБ: 1 — ТС-80 (V), 2 — CVS (III), 3 — ВНИИЗЖ (III), 4 — 496 (IV), 5 — 473 (IV), 6 — 634 (III), 7 — отрицательный контроль, 8 — без антигена. Образцы 1, 2, 4–7 исследовали в цельном виде. В образце 3 концентрация ВБ составила 1 мкг/мл

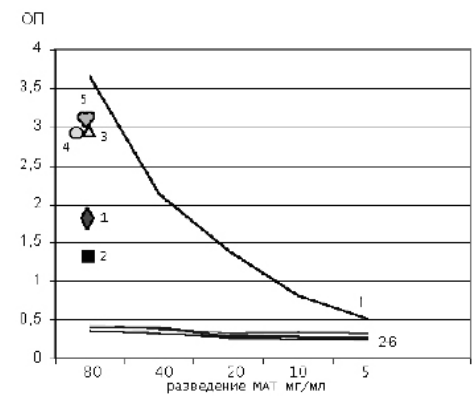

Рисунок 5. Иммунореактивность антител ВНИИЗЖ/G-1 с разными антигенными вариантами ВБ: 1 — ВНИИЗЖ (III), 2 — ТС-80 (V), 3 — CVS (III), 4 — 461 (III), 5 — 496 (IV), 6 — отрицательный контроль. Образцы 2–6 исследовались в цельном виде, в образце 1 концентрация ВБ составила 1 мкг/мл. Значками 1–5 обозначены значения ОП тех же вариантов ВБ, но исследованных с помощью антирабических поликлональных антител

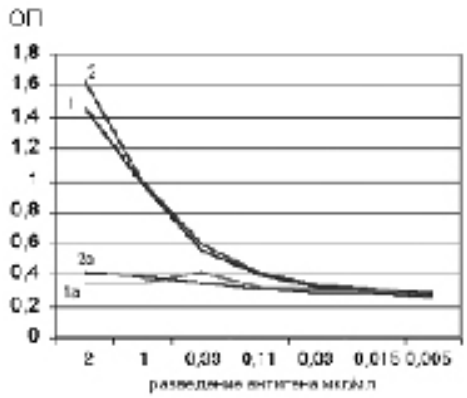

Рисунок 6. Иммунореактивность МАт ВНИИЗЖ/G-1 с ВБ штаммов ВНИИЗЖ (1) и РВ-97 (2). Моноклональные антитела использовали в концентрации 40 мкг/мл. 1а и 2а — ОП отрицательных контролей при исследовании штаммов ВНИИЗЖ и РВ-97, соответственно

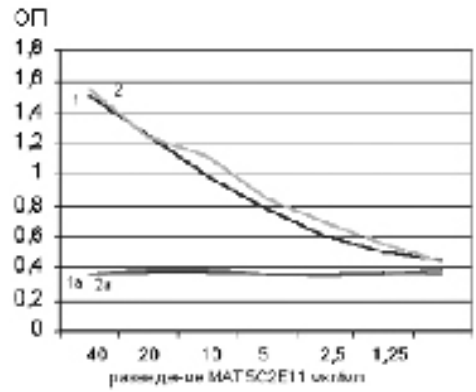

Рисунок 7. Иммунореактивность МАт ВНИИЗЖ/G-1 с ВБ штаммов ВНИИЗЖ (1) и РВ-97 (2). ВБ обоих штаммов использовали в концентрации 2 мкг/мл. 1а и 2а — ОП отрицательных контролей при исследовании штаммов ВНИИЗЖ и РВ-97, соответственно

ну, в отпечатках мозга кролика, инфицированного вирусом бешенства штамма CVS, наблюдали только слабую диффузную и краевую флуоресценцию, характерную для вирусного гликопротеина, интегрированного в мембранные структуры клетки.

В препаратах, обработанных МАт ВНИИЗЖ/N-1 в концентрации 0,029 мг/мл, наблюдали типичную для бешенства интенсивную иммунофлуоресценцию N-типа — четкие внутриклеточные включения разной формы и величины при отсутствии неспецифического фонового свечения. Следовательно, антитела ВНИИЗЖ/N-1 с высокой активностью способны выявлять внутриклеточный РНП ВБ, а поскольку основным белком этого комплекса является N-белок, то с большой долей вероятности можно утверждать, что данный клон специфичен к N-белку ВБ.

В непрямом сэндвич-варианте ИФА

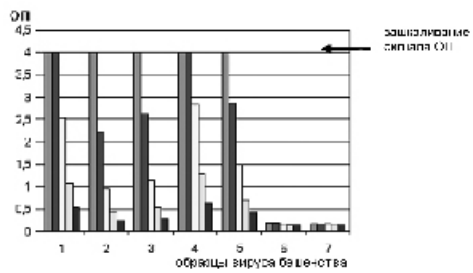

Рисунок 8. Результаты исследования иммунореактивности антител ВНИИЗЖ/N-1 с разными антигенными вариантами ВБ: 1 — CVS (III), 2 — ВНИИЗЖ (III), 3 — РВ-97 (III), 4 — 461 (III), 5 — 496 (IV), 6 — отрицательный контроль, 7 — без антигена. Антитела ВНИИЗЖ/N-1 использовали в концентрации 40 мкг/мл, антигены наносили в последовательных трехкратных разведениях, начиная с цельного

изучали способность клона ВНИИЗЖ/N-1 перекрестно реагировать с разными антигенными вариантами вируса бешенства, в пределах I серотипа: CVS (III), ВНИИЗЖ (III), РВ-97 (III), 461 (III), 496 (IV) (рис. 8).

Как видно из рис. 8, антитела ВНИИЗЖ/N-1 приблизительно одинаково реагировали со всеми образцами ВБ, что позволяет сделать предположение о возможности использования их для диагностики бешенства. Для подтверждения данного предположения указанные антитела были взяты в качестве детекторных при выполнении непрямого сэндвич-варианта ИФА с 20 полевыми изолятами вируса бешенства, выделенными в Нижегородской области. С 19 изолятами был получен положительный специфичный сигнал. При исследованиях этих же образцов с использованием поликлональных антирабических антител все 20 изолятов были положительными по вирусу бешенства. Необходимо отметить, что моноклональные антитела ВНИИЗЖ/N-1 в полной мере реагировали только с нативным антигеном. После инактивации полевых образцов вируса бешенства в течение 30 мин при +56° С специфичный сигнал с антителами ВНИИЗЖ/N-1 снизился в несколько раз, а в ряде случаев до уровня сигнала с отрицательным контрольным препаратом. С поликлональными антирабическими антителами снижения сигнала или не происходило, или оно было несущественно. Эти данные позволяют предположить, что антитела ВНИИЗЖ/N-1 специфичны к лабильному эпитопу N — белка вируса бешенства.

Поскольку антитела ВНИИЗЖ/N-1 не выявили один изолят ВБ из 20 исследован-

ных, то вопрос о возможности изготовления диагностикума на его основе остается открытым и нуждается в дополнительной проверке на бóльшем количестве полевых изолятов вируса. По-видимому, наиболее оптимальным вариантом для разработки диагностикума на основе моноклональных антител является использование комбинации из нескольких антител, специфичных к разным консервативным эпитопам N-белка вируса бешенства. С другой стороны, если в дальнейших экспериментах будет выявлена различная специфичность антител ВНИИЗЖ/N-1 к разным штаммам и изолятам ВБ, то их можно будет использовать для изучения антигенного разнообразия ВБ, циркулирующего на территории Российской Федерации.

Выводы

Таким образом, в результате проведенной работы, были отобраны четыре гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфичные к разным антигенам ВБ ВНИИЗЖ. Антитела ВНИИЗЖ/G-1, ВНИИЗЖ/G-2, ВНИИЗЖ/G-3 оказались специфичными к вирусному гликопротеину. При этом антитела ВНИИЗЖ/G-1 обладали вируснейтрализующей активностью и реагировали только с вирусом бешенства штаммов ВНИИЗЖ и РВ-97, что предполагает возможность использования их для дифференциации вакцинных штаммов вируса бешенства и его полевых изолятов.

Антитела ВНИИЗЖ/N-1 оказались специфичными к рибонуклеопротеину вируса бешенства и перекрестно реагировали с разными штаммами и изолятами вируса. С помощью этих антител в НРИФ выявляли скопления рибонуклеопротеина в клетках головного мозга животных, павших от бешенства. С целью изучения возможности применения данного антитела для диагностики бешенства или его использования для изучения антигенного разнообразия ВБ, необходимо исследовать его иммунореактивность в отношении большего количества известных штаммов и изолятов ВБ из разных регионов РФ.

РЕЗЮМЕ

Гибридомы, секретирующие моноклональные антитела (МАт) к вирусу бешенства (ВБ), получали путем гибридизации спленоцитов BALB\c мышей, иммунизированных вакцинным штаммом ВБ ВНИИЗЖ, с клетками мышиной миеломы линии NSO/1. Свойства полученных МАт изучали в реакциях непрямой иммунофлуоресценции и твердофазного сэндвич-ИФА с использованием разных штаммов и полевых изолятов ВБ, а также в реакции нейтрализации ВБ на культуре клеток ВНК-21. В результате проведенных исследований отобрали три клона, продуцирующие Мат, специфичные к гликопротеину, и один клон, секретирующий МАт к рибонуклеопротеину ВБ (ВНИИЗЖ/N-1). МАт ВНИИЗЖ/G-1, специфичные к гликопротеину ВБ, обладали вируснейтрализующей активностью и реагировали с ВБ только вакцинных штаммов. МАт ВНИИЗЖ/N-1 выявляли скопления рибонуклеопротеина ВБ в клетках головного мозга животных, павших от бешенства, в реакции иммунофлуоресценции и реагировали с разными штаммами и полевыми изолятами ВБ.

ABSTRACT

Hybridomas secreting monoclonal antibodies (MAbs) against rabies virus (RV) were prepared by hybridization of splenocytes of BALB/c mice immunized by RV vaccine strain (ARRIAH strain) with the mouse myeloma NSO/1 cell line. Properties of prepared MAbs were examined with indirect immunofluorescence assay and solid-phase sandwich ELISA using different rabies virus strains and field isolates as well as with rabies virus neutralization test in BHK-21 cell culture. As a result, three clones producing glycoprotein-specific MAbs and one clone secreting Mabs to RV ribonucloeprotein (ARRIAH/N-1) were selected. RV glycoprotein-specific ARRIAH/G-1 MAbs possessed virus-neutralizing activity and reacted with RV vaccine strains only. Immunofluorescence assay with ARRIAH/N-1 MAbs detected RV ribonucleoprotein accumulations in brain cells of animals died of rabies. ARRIAH/N-1 MAbs reacted with different RV strains and field isolates.

Литература

1. С.В. Грибенча, О.В. Василенко, В.А. Кузьмицкая и др. Взаимодействие моноклональных антител к структурным белкам вакцинного вируса Внуково-32 с другими вирусами группы бешенства // Вопр. вирусол. 1991. № 5. С. 399–402.
2. Н.А. Назаров, А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков. Сравнительная характеристика антител, полученных на разные антигены вируса бешенства // Биол.-экол. пробл. заразных бол. диких ж-ных и их роль в патологии с.-х. ж-ных и людей: матер. Междунар. науч.-практ.-конф. окров, 2002. С. 168–170.
3. В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, И.В. Никишин. Получение и использование иммуноасцитической жидкости, специфичной к вирусу бешенства // Пробл. инфекц. патологии с.-х. ж-ных: тез. докл. конф. Владимир, 1997. С. 182–183.
4. С.В. Грибенча, О.В. Василенко, В.А. Фуралев и др. Получение и характеристика гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к структурным белкам вируса бешенства, штамм Внуково-32 // Вопр. вирусол. 1991. № 4. С. 318–321.
5. В.В. Недосеков, А.А. Стрижаков, А.Д. Середа, Т.Р. Кирюхина. Получение и характеристика моноклональных антител к структурным белкам вируса бешенства штамм «ТС-80» // Доклады РАСХН. 1999. № 4. С. 38–40.
6. А.П. Пономарев, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков и др. Совершенствование метода очистки и концентрирования вируса бешенства // Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельдта-Якоба и др. прионные болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена: ма-

тер. Междунар. конф. Покров, 2001. С. 49–51.
7. J.D. Beatty, B.G. Beatty, W.G. Vlahos. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // J. Immunol. Methods. 1987. V. 100. P. 173–179.
8. P.L. Ey, S.J. Prowse, C.R. Leukin. Isolation of pure IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose // Mol. Immunol. 1978. V. 15. P. 429–436.
9. G. Kцhler, C. Milstein. Continuos cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. V. 256. P. 495–497.
10. U. K. Laemlii. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227, N 5259. P. 680–685.
11. A.E. Metlin, J. Cox, S.S. Rybacov et al. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia // J. Vet. Med. 2004. V. 51. P. 94–96.
12. W.E. Marissen, R.A. Kramer, A. Rice et al. Novel rabies virus-neutralizing epitope recognized by human monoclonal antibody: fine mapping and escape mutant analysis // J. Virol. 2005. V. 79, N 8. P. 4672–4678.
13. P. Perrin. Techniques for the preparation of rabies conjugates // Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, 1996. P. 433–444.
14. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chemistry. 1951. V. 193. P. 265–275.
15. J.S. Smith, A.A. King. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssaviruses // Laboratory techniques in rabies. - 4th ed. – Geneva, 1996. - P. 145-156.
16. C.V. Trimarchi, R.D. Rudd, M. Safford. An vitro virus neutralization test for rabies antibodi // Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, 1996. P. 145–156.