Оценка активности вакцин против бешенства методом иммуноферментного анализа

Assessment of the activity of vaccines against rabies by the method of enzyme immunoassay

Маркова Е.В.

Московская обл.

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-10
УДК: 619:615.37.012

Ключевые слова: бешенство, вакцина, профилактика, определение содержания гликопротеина, стандартизация.

Key words: rabies, vaccine, prophylaxis, determination of glycoprotein content, standardization.

Резюме. Количественное содержание специфического вирусного белка – гликопротеина в вакцинах является важным показателем, характеризующим их эффективность. Целью выполненных исследований явилась разработка метода иммуноферментного анализа для оценки активности вакцин против бешенства. В результате разработана тест-система на основе "сэндвич"-варианта ИФА с использованием моноклональных антител к различным антигенным детерминантам гликопротеина вируса бешенства, что обеспечивает высокую чувствительность и специфичность метода. Компьютерная программа на основе преобразования "4-параметрический логарифмический логистический метод" или "logit-log" рекомендуется для построения калибровочной кривой с целью количественного определения гликопротеина вируса бешенства в "сэндвич"-варианте ИФА в живой и инактивированной, адсорбированной и неадсорбированной антирабической вакцине, в материале органо-тканевого и культурального происхождения. Чувствительность тест-системы ИФА составляет 0,01125 МЕ/см³.

Summary. The quantitative content of a specific viral protein glycoprotein in vaccines is an important indicator characterizing their effectiveness. The aim of the studies was the development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the evaluation of the activity of rabies vaccines. As a result, a test system based on the sandwich ELISA variant was developed using monoclonal antibodies to various antigenic determinants of the rabies virus glycoprotein, which provides high sensitivity and specificity of the method. A computer program based on the transformation "4-parameter log-logistic method" or "logit-log" is recommended for constructing a calibration curve for the quantitative

determination of the rabies glycoprotein in the ELISA sandwich variant in a live and inactivated, adsorbed and nonadsorbed rabies vaccine in material of organo-tissue and cultural origin. The sensitivity of the ELISA test system is 0,01125 IU / cm³.

Введение

До настоящего времени бешенство остаётся одной из самых опасных инфекционных болезней, от которой ежегодно в мире погибает около 50000 человек и 1 млн. животных [1, 2]. Половина из обратившихся за помощью получает курс антирабического лечения [3], что диктует необходимость интенсификации исследований по совершенствованию качества антирабических препаратов.

При получении вакцины против бешенства необходима стандартизация количественной оценки содержания гликопротеина вируса бешенства в материале для производства вакцин для животных и человека.

Для определения иммуногенной активности инактивированных антирабических вакцин широко используется рекомендованный ВОЗ, метод NIH (United States National Institutes of Health). Данный тест был разработан в США в 1953 и в неизменном виде используется до сих пор. Несмотря на широкое использование этого теста, рядом авторов отмечены определённые недостатки постановки этого метода: интрацеребральное заражение мышей не воспроизводит естественный путь попадания вируса в организм животного, а сам тест предусматривает 2 вакцинации с интервалом в 7 дней, что может маскировать настоящие результаты теста и завышать результаты в вакцинах с низкой иммуногенной активностью [4].

В постановке метода NIH и его модификаций существуют проблемы в неточности и значительной разницы полученных результатов в пределах лабораторий. К этому следует добавить риск опасности для персонала при работе с живым вирусом бешенства, который относится к возбудителям II группы патогенности. Также существуют проблемы, связанные с гуманным обращением с животными, так как интрацеребральное введение вируса "жестокое", как и сам ход болезни.

На основе данных, полученных при изучении молекулярной структуры вируса бешенства, установлено, что основные антигенные детерминанты, индуцируют защитный иммунный ответ, находятся на гликопротеине, содержание которого коррелирует с иммуногенностью вакцин против бешенства. Поэтому, при оценке качества вакцин Комитет экспертов ВОЗ с 1992 года предлагает использовать альтернативные методы *in vitro*, которые уже с 1984 совершенствуются для определения содержания антигенов в вакцинах против бешенства. Одним из перспективных подходов количественной оценке важнейших белков вирусов в инактивированном и неинактивированном материале является использование метода иммуноферментного анализа.

Результаты применения "сэндвич"-варианта ИФА для количественной оценки содержания гликопротеина вируса бешенства коррелировали с методом NIH. Это сообщается в результатах исследований Недосекова В.В., 1998, Лосич М.А., 2011, Hervijnen V.R., 2011, Cliquet F., 2006–2008 и др., установивших прямую зависимость между количественным содержанием гликопротеина вируса бешенства в вакцине и её иммуногенной активностью [1-4].

Авторы / Authors

Маркова Е.В., старший научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: hotaalanai@gmail.com

Попова В.М., ведущий научный сотрудник, д.б.н., e-mail: burevestnik46@mail.ru

Преображенская А.С., научный сотрудник, отдел молекулярной биологии и вирусологии, e-mail: a.pcrvet@gmail.com

Иванов И.В., старший научный сотрудник, к.б.н., отдел молекулярной биологии и вирусологии, e-mail: gogenhamer@yandex.ru

Скороходова Л.А., научный сотрудник, отдел молекулярной биологии и вирусологии, e-mail: biolog1967@mail.ru

Матвеева И.Н., заведующая отделом молекулярной биологии и вирусологии, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ ВНИТИБП), e-mail: biolog1967@mail.ru

Markova E.V., Popova V.M., Preobrazhenskaya A.S., Ivanov I.V., Skorokhodova L.A., Matveeva I.N.

Задачей настоящего исследования является создание высокоспецифичного, чувствительного, простого и быстрого в исполнении способа количественного определения гликопротеина вируса бешенства с использованием метода иммуоферментного анализа при производстве вакцин против бешенства.

Использование тест-системы ИФА требует стандартизации учёта результатов, что ставит задачу введения положительного контрольного образца с известной специфической активностью. В связи с этим в состав тест-системы включена референс-вакцина, из штамма "Щёлково-51", представляющая собой Отраслевой стандартный образец иммуногенности, откалиброванный по Международному стандарту антирабической вакцины. Референс-вакцина производится по технологии, разработанной в ФГБНУ "ВНИТИБП".

В иммуноанализе "сэндвич"-варианта на первой стадии на поверхность планшета сорбируются моноклональные антитела, специфичные к исследуемому антигену-гликопротеину (антитела-подложки). После удаления не связанных молекул антител добавляется образец, содержащий антиген. Для детекции образовавшегося комплекса антитела-подложки-антиген добавляются вторые, конъюгированные с пероксидазой хрена антитела, специфичные к другому, пространственно удалённому эпитопу антигена. Использование в иммуноанализе "сэндвич"-варианта пары моноклональных антител, специфичных к двум различным эпитопам антигена, позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности при определении антигена в любых гетерогенных образцах, даже в плазме крови.

Для проведения "сэндвич"-варианта ИФА в лунки полистироловых 96-луночных микропанелей вносили фиксирующие МкА в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 в подобранной концентрации $1,6 \pm 0,2$ мкг на лунку и инкубировали 45–60 минут при температуре $+22-24$ °C, при встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. На следующем этапе лунки сенсibilизированных микропанелей заполняли блокирующим раствором 1 % бычьего сывороточного альбумина в фосфатно-солевом буфере с 0,1% Tween-20 и инкубировали при температуре $+22-24$ °C 30 мин. Затем

в лунки микропанелей вносили в двух повторностях испытуемые вакцины в разведении 1:10 и эталонную референс-вакцину, в разведениях начиная с 1:10 и до 1:320. Инкубировали 45–60 мин при температуре $+22-24$ °C. Далее использовали иммунопероксидазный конъюгат в рабочем титре (1:5000). На всех этапах реакции микропанели с реагентами инкубировали при комнатной температуре 45–60 мин и пятикратно отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0,1% Tween-20. В качестве субстрата использовали 3,3',5,5' тетраметилбензидин (ТМБ) с H_2O_2 . Интенсивность окраски в лунках останавливали через 10–15 мин после внесения 1М H_2SO_4 и сигнал интенсивности оптической плотности определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Для определения интервала иммуоферментной тест-системы, в которой значения оптической плотности в зависимости от концентрации будут соответствовать линейному диапазону калибровочной кривой, выбрали следующие концентрации: область ожидаемых нижних пределов измерений – 0,00562 МЕ и ожидаемых верхних пределов – 0,18 МЕ.

Приготовленные растворы с известным содержанием гликопротеина в МЕ проанализировали иммуоферментным методом и получили график зависимости оптической плотности от концентрации гликопротеина. Из данных, представленных на рисунке 1, следует, что концентрации от 0,18 МЕ до 1,8 МЕ находятся в области плато, то есть дальнейшее увеличение концентрации не приводит к пропорциональному возрастанию оптической плотности. С учётом этого требования концентрации от 0,18 МЕ и выше не могут войти в область диапазона калибровочной кривой и по графику видно, что концентрации, выполненные без разведения существенно занижают истинное значение гликопротеина вируса. Для иммуоферментных методов рекомендуются как минимум четыре точки концентраций, которые должны "ложиться" на прямую линию. На рисунке 2 продемонстрировано, что на данной кривой укладывается в диапазон исследования линейности тест-системы как минимум четыре точки, то есть требование линейности по числу точек на кривой соответствует современным требованиям, предъявляемым при разработке и оптимизации количественных иммуоферментных тест-систем. Данные оптической плотности без логарифмирования в диапазоне концентраций от 0,01125 МЕ до 0,09 МЕ показали хорошую линейную зависимость с высоким коэффициентом корреляции – $r=0,9$ $n=6$ и $p<0,05$.

При определении диапазона применения при анализе точки калибровочной кривой было обнаружено, что значения диапазона стандартных отклонений и критерия Стьюдента для всех точек удовлетворяют критерию приемлемости, что свидетельствует о правильности выбора способа приготовления разведений контрольного образца (референс-вакцины) для использования его в качестве калибратора.

Если бы в ИФА существовала линейная зависимость величины сигнала от концентрации во всем диапазоне измерения, то это позволило бы избавиться от многих проблем, в том числе и от субъективности при построении калибровочной кривой (КК) "ручным" способом. Для визуального расширения линейной области графика и последующего упрощения процедуры "рисования" графика применили преобразование осей, используя логарифмическую шкалу. В случае "сэндвич"-варианта логарифмического преобразования достаточно для линеаризации КК.

На рис. 2 показаны результаты построения калибровочной кривой с логарифмированием, где по оси ординат откладывается логарифм значений оптической плотности, а по оси абсцисс – логарифм концентрации, соответствующий определённому показателю иммуногенности.

ИФА тест-система для определения гликопротеина вируса бешенства производится в отделе молекулярной биологии и вирусологии ФГБНУ "ВНИТИБП". До настоящего времени выпущены четыре серии тест-системы.

Рис. 1 Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации гликопротеина при титровании стандартной референс-вакцины против бешенства

Рис. 2 Калибровочный график зависимости логарифма оптической плотности от логарифма концентрации гликопротеина при титровании референс-вакцины против бешенства

Таблица 1.

Порядок и продолжительность контроля антирабической вакцины в процессе производства с помощью метода ИФА в сравнении с традиционными методами

Название технологического этапа	Технологический контроль	
	Традиционными методами	Методом сэндвич-варианта ИФА
Определение инфекционной активности посевного вируса	Метод <i>in vivo</i> : 21 сутки на мышах, на 1 пробу не менее 60 мышей	4 часа при комнатной температуре
Определение инфекционной активности вакцинного сырья	Метод <i>in vivo</i> : 21 сутки на мышах, на 1 пробу не менее 60 мышей	4 часа при комнатной температуре
Определение активности после инактивации вакцинного сырья	Тест НИИ-28 суток Не менее 100 мышей	4 часа при комнатной температуре
Определение активности готовых форм	Тест НИИ-28 суток не менее 100 мышей	4 часа при комнатной температуре
Общее время технологического контроля	98 суток	16 часов

Преимущества использования ИФА для количественной оценки основного белка, отвечающего за иммуногенность вакцин, представлено в таблице 1.

Таким образом, предложенный способ позволяет определить количественное содержание гликопротеина вируса в живой и инактивированной, сорбированной и несорбированной антирабической вакцине, в материале органо-тканевого и культурального происхождения. Способ предусматривает постановку иммуноферментной реакции с построением калибровочной кривой. Количественную оценку гликопротеина вируса ведут на основании регистрации сигнала оптической плотности исследуемого образца вакцины, и сравнения его с сигналом оптической плотности разведений стандартной эталонной антирабической референс-вакцины, содержащих известные показатели индексов иммуногенности, выраженные в МЕ. Способ позволяет исключить работу персонала лабораторий с живым вирусом бешенства штамма "CVS", отказаться от использования большого количества животных, ускорить получение количественного результата, удешевить затраты на оценку каче-

ства вакцины против бешенства по показателю иммуногенности, количественное определение гликопротеина методом ИФА коррелирует с методом НИИ, не требует сложного и дорогостоящего оборудования, обладает воспроизводимостью. Коэффициент вариации по оптической плотности не превышает 10%.

Литература

1. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. М.: 2001. - с.16-24
2. Лосич М.А. Иммунобиологические свойства штамма ERA-CB 20M вируса бешенства и разработка на его основе антирабической вакцины: дисс. канд. биол. наук: Лосич Милена Анатольевна. - М., 2014.-146 С.
3. НІКІТОВА А. П. Формування антирабичного імунітету та вдосконалення методів контролю імуногенності інактивованих антирабичних вакцин: дисс. канд. вет. наук 16.00.03 - ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія НІКІТОВА А.П.-2015. -Київ -133 с.
4. Недосеков В.В. Разработка и совершенствование средств и методов оценки эффективности вакцин против бешенства 16.00.03-ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология и иммунология: дисс. канд. вет. наук: Недосеков Виталий Владимирович-1998.- Покров.-178 С.