



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) U (11) 7869
(51) C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/10 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2022/0973.2

(22) 08.11.2022

(45) 03.03.2023, бюл. №9

(72) Хусаинов Дамир Микдатович; Исламов Есенбай Исраилович; Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович; Сансызбай Абылай Рысбайұлы; Мусаев Жомарт Ериқұлы; Джанабекова Гульмира Кумискалиевна; Батанова Жанат Мухаметкалиевна; Абдуалиева Асем Абдимуратовна; Омарбекова Уржан Жакатаевна; Нұрғазы Бану Өміртайқызы; Орынханов Канат Аманжолович; Бредихина Елена Константиновна; Турганбаева Гульнар Елдесбаевна; Омарбекова Гульжан Кабылжановна; Ахметжанова Молдир Нурлановна; Махмутов Абзал Касенович; Сабырбекова Шынар Касеновна; Мухтарова Элеонора Шавкатқызы; Бектемиров Алихан; Теміржан Әйгерім Мұратқызы; Джунусова Райхан Жексенбаевна; Алиев Абай Канатович; Куттымуратова Куралай Бисеновна; Мухитдинова Гульнара Ергалиевна; Сарманов Абдумурат Мамырбекович; Ибажанова Асем Сериковна; Кулатаев Бейбит Турганбекович

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный исследовательский университет»

(56) KZ 14990 A, 15.11.2004

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
ИММУНОГЛОБУЛИНА

ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦИРУЮЩЕГО

(57) Полезная модель относится к области ветеринарной вирусологии и иммунологии, в частности, к серологической диагностике бешенства в реакции иммунофлуоресценции.

Задачей полезной модели является повышение специфической активности антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина при диагностике бешенства. Техническим результатом является повышение активности и специфичности антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина.

Задача достигается тем, что осуществляют выращивание аттенуированного фиксированного референс-штамма вируса бешенства "CVS-11" в культуре клеток E.derm на жидкой питательной среде Игла MEM с добавлением 10% по объему сыворотку крови КРС, pH 7,5-7,6, в течение 4-5 суток, получают вирусосодержащую суспензию, проводят инактивацию 0,02% этиленимином, добавляют масляный адъювант Монтанид, перемешивают 1000 оборотов в 3 мин, полученным антигеном осуществляют иммунизацию продуцентов, получают антирабическую сыворотку, выделяют иммуноглобулин, осуществляют конъюгацию антител с флуорохромом (ФИТЦ) с последующей очисткой целевого продукта от несвязавшегося красителя.

(19) KZ (13) U (11) 7869

Полезная модель относится к области ветеринарной вирусологии и иммунологии, в частности, к серологической диагностике бешенства в реакции иммунофлуоресценции.

Известен способ получения иммуноглобулина диагностического антирабического флуоресцирующего (ИДАФ) включающий получение рабического антигена, иммунизацию продуцентов рабическим антигеном, получение антирабической сыворотки и выделение иммуноглобулина, конъюгацию антител с флуорохромом (ФИТЦ) с последующей очисткой целевого продукта от несвязавшегося красителя (Предварительный патент на изобретение Республика Казахстан №14990 «Способ получения иммуноглобулина диагностического антирабического флуоресцирующего (ИДАФ)», Кл. А61К 39/205, 15.11.2004, бюл. №11).

Недостатком способа является то, что для иммунизации животных-продуцентов используют рабический антиген, содержащий мозговую ткань, поэтому полученный иммуноглобулин обладает низкой специфической активностью при диагностике бешенства.

Задачей полезной модели является повышение специфической активности антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина при диагностике бешенства.

Техническим результатом является повышение активности и специфичности антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина.

Задача достигается тем, что осуществляют выращивание аттенуированного фиксированного референс-штамма вируса бешенства "CVS-11" в культуре клеток E.derm на жидкой питательной среде Игла MEM с добавлением 10% по объему сыворотку крови КРС, pH 7,5-7,6, в течение 4-5 суток, получают вирусосодержащую суспензию, проводят инактивацию 0,02% этиленимином, добавляют масляный адъювант Монтанид, перемешивают 1000 оборотов в 3 мин, полученным антигеном осуществляют иммунизацию продуцентов, получают антирабическую сыворотку, выделяют иммуноглобулин, осуществляют конъюгацию антител с флуорохромом (ФИТЦ) с последующей очисткой целевого продукта от несвязавшегося красителя.

E. Derm (NBL-6) представляет собой клеточную линию, демонстрирующую морфологию фибробластов, которая была выделена в 1965 году из дермы 4-летней самки лошади и депонирована в США (Culture of Animal Cells, a manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, 3rd edition, published by Alan R. Liss, N.Y., 1994.) под номером E. Derm (NBL- 6) (ATCC CCL-57) и применяется для выращивания вирусов в лабораторных условиях.

Способ осуществляется следующим образом.

Техника получения антигена

Матриксную серию вируса готовят в необходимом количестве 10-50 флаконов в зависимости от потребности производства.

Для получения вирусосодержащей суспензии используют выращенную в матрасах перевиваемую

линию культуры клеток «E. Derm» с хорошим монослоем. Культуру клеток в количестве 6-10 матрасов заражают вакцинным штаммом вируса CVS-11.

В культуре не должно быть каких-либо признаков спонтанной дегенерации клеток (зернистости, вакуолизации клеток, очагов разрушения клеток, отслоения клеток от стекла, изменения характерной формы клеток).

Для этого берут несколько флаконов лиофилизированного вируса, разбавляют поддерживающей питательной средой в соотношении 1:100 и инфицируют культуру клеток в матрасах.

Инфицированные культуры выдерживают в термостате при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. с периодическим (через каждые 15 мин.) орошением поверхности матраса монослоя клеток внесенным вирусом. После этого в матрасы заливают поддерживающую среду по 100 см^3 в 1-литровые и по 150 см^3 в 1,5-литровые матрасы.

Для контроля оставляют незараженными 2-3 матраса, в которые вносят только поддерживающую среду, и инкубируют как инфицированные в стационарном положении при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Смену среды в матрасах проводят через 2 сут. Развитие вируса в культуре клеток определяют по характерному цитопатическому действию. Микроскопию матрасов проводят ежедневно, начиная с 2-го дня инкубации.

При развитии выраженных цитопатических изменений (70-90% клеточного монослоя), обычно на 5-7 сут., матрасы замораживают при температуре минус $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$. В контрольных матрасах, не должно быть каких-либо деструктивных изменений клеток. На следующие сутки замороженные культуры оттаивают при комнатной температуре, из каждого матраса берут пробы в объёме по 5 см^3 для проверки на отсутствие бактериального загрязнения и определения активности вируса. Вирусную суспензию до получения результатов контроля на стерильность и определения активности хранят при температуре $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ не более 15 сут. При активности вируса не ниже $105,5 \text{ ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ стерильный вирусосодержащий материал используют для приготовления антигена.

Инактивацию проводят 0,02% этиленимином.

После этого, 1:1 к инактивированной вирусосодержащей суспензии добавляем в масляный адъювант Монтанид, перемешиваем 1000 оборотов в 3 мин.

Техника иммунизации животных

Животных иммунизируют подкожными инъекциями антигеном.

Инъекции выполняют в подлопаточную область, шею и круп, 4-8кратно, с интервалом 10-20 дней в дозах $10-50 \text{ см}^3$ с соблюдением правил асептики и антисептики.

Наращение титра рабических антител проверяют в пробах сыворотки крови реакции диффузной преципитации (РДП) в агаровом геле с антигеном, приготовленного из штамма CVS.

При достижении преципитационного титра 1:32-1:128 производится взятие крови с интервалом 21 день, первоначально из расчета 400 см³, а при последующих крововзятиях - 16 см³ на 1 кг живой массы.

Сыворотка изготавливается стерильно и хранится в условиях холодильника при температуре 4-6°C.

Техника получения антирабического иммуноглобулина.

Имуноглобулин выделяют спиртовым методом из высокоактивной без следов гемолиза антирабической сыворотки, используя раствор 53%-ного этанола.

Предварительно, для освобождения от термоллабильных ингибиторов сыворотка прогревается в малообъемной стеклянной посуде (1000-3000 см³) в водяной бане 30 минут при температуре 56-58°C.

Сыворотка должна иметь рН 7,0-7,2 и это достигается добавлением 2М ацетатного буфера рН 4,65 в количестве 2-6 мл на 1 л. Ацетатный буфер готовится смешиванием в соотношении 1:1 отдельно приготовленных 2М растворов уксуснокислого натрия и ледяной уксусной кислоты.

Сыворотку с установленной рН охлаждают до 0°C и одновременно охлаждают до минус 15-20°C предназначенный для осаждения раствор 53%-ного спирта на дистиллированной воде.

В условиях холодильной камеры при температуре 0°C к охлажденной сыворотке медленно при постоянном перемешивании добавляют равный объем охлажденного спирта. Смесь продолжают перемешивать 30 минут, снижая температуру до минус 5°C, и оставляют на 16-18 часов для формирования осадка.

Прозрачную надосадочную жидкость удаляют, выпавшие в осадок иммуноглобулины отделяют от некоторого количества надосадочной жидкости центрифугированием в рефрижераторной центрифуге при температуре минус 5°C.

Осадок глобулина растворяют в охлажденном до 4°C 0,15М растворе хлорида натрия, постепенно повышая температуру до комнатной (+20-+25°C). Концентрацию белка в растворе устанавливают в пределах 7-8%.

Для коррекции солевого состава и удаления незначительного количества спирта раствор иммуноглобулина диализируют против 0,15М раствора хлорида натрия при четырехкратной его смене и температуре +4°C в течение 2-х суток в целлофановых мешочках. Затем глобулин осветляют от незначительной опалесценции центрифугированием при той же температуре в течение 30 минут при 4000 об/мин.

Имуноглобулин по фракционному составу состоит из гамма-глобулина, со следами бета-глобулина.

Приготовление флуорисцирующих антител.

Для конъюгации (метки) антител предпочтительнее применять не нативные сыворотки, а их глобулиновые фракции. Необходимое количество флуорохрома для

конъюгации рассчитывают по концентрации в препарате белка (0,5-5 мг флуорохрома на 100 мг белка).

В качестве флуорохрома используют изотиоцианат флуоресцина (ФИТЦ), максимально поглощающий фиолетово-синие лучи и дающий ярко-зеленую флуоресценцию. Для проведения конъюгации фракцию глобулина доводят с помощью 0,01 М забуференного раствора поваренной соли до содержания белка, равного 1%, а с помощью 0,5 М карбонатного буфера доводят рН до 9,0. Суспензию охлаждают до 4°C и очень медленно прибавляют к ней при постоянном перемешивании красящее вещество. ФИТЦ применяют в количестве 7,5 мг красителя на 10 мл 1%-ного белка.

После добавления красителя смесь следует оставить на несколько часов (18-22 ч) при температуре 4°C для достижения полной конъюгации.

Для удаления неспецифических флуорисцирующих компонентов осуществляют фильтрацию через сефодекс G - 25. Сефодекс кладут в колонку и промывают его 0,01 М забуференным раствором поваренной соли. Предварительно отцентрифугированный конъюгат осторожно помещают на сефодекс и заливают соответствующим количеством 0,01 М забуференного раствора поваренной соли. Очищенный конъюгат собирают в соответствующий сосуд.

Раствор флуорисцирующего иммуноглобулина доводят до 5%-ной концентрации 0,15М раствором хлористого натрия, консервируют мертиололом 1:5000, исследуют на специфичность и флуорисцирующую активность и подвергают лиофильной сушке.

Г. Определение флуорисцирующей активности и моноспецифичности антирабического глобулина.

Флуорисцирующая активность иммуноглобулина определяется прямым методом иммунолюминисцентной микроскопии (ПМИМ).

При диагностике бешенства отпечатки готовят из свежего или свежемороженого материала - аммонова рога, коры полушарий, мозжечка и др., используя при этом тщательно обезжиренные эфиром или спиртэфиром предметные стекла (лучше специальные для люминисцентной микроскопии, толщиной 1,5 мм). Отпечатки должны быть тонкими, разнослойными. Это достигается тем, что с кусочка ткани, легко прикрепляющегося к фильтровальной бумаге или тонкой деревянной досточке-шпателью, делают 1-2 грубых отпечатка на отдельном стекле (они не используются в работе), а затем с той же поверхности кусочков делают отпечатки на отдельные предметные стекла, используемые для люминисцентной микроскопии. С каждого исследуемого кусочка мозговой ткани необходимо сделать не менее 4 отпечатка на 2 стекла.

Для контроля аналогично приготавливают препараты из мозга здоровых животных (можно использовать для этого мозг всяких животных, не

болеющих рабической инфекцией). Препараты после высушивания на воздухе в течение 3-5 минут фиксируют в ацетоне при +12°C в течение 4 часов - при работе с уличным вирусом бешенства и 10 минут - при работе с вакцинным вирусом-фикс.

По мере надобности вскрывают ампулу с ДАФИ, ее содержимое растворяют в 1мл дистиллированной воды (основное разведение, рН 7,2-7,4), а затем постепенно добавляя физиологический раствор хлорида натрия, или фосфатнобуферный раствор (рН 7,2-7,4), доводят общий объем иммуноглобулина до объема, создающего «рабочее разведение». Рабочее разведение ДАФИ не должно содержать даже мельчайших количеств визуально видимого осадка или хлопьев препарата. Рабочее разведение ДАФИ годно к применению в течение 2-х недель после приготовления, при условии хранения в темном месте при температуре +4°C (+ - 2°) в хорошо укупоренной склянке и при условии сохранения исходной полной его растворенности.

На фиксированные в ацетоне препараты-отпечатки наносят каплями приготовленный в «рабочем разведении» ДАФИ, покрывая им весь препарат (отпечаток). Затем препараты (предметные стекла) помещают во влажную камеру, например, чашку Петри или закрытый эмалированный лоток, обычный стерилизатор, с увлажненным дном и тампонами влажной ваты и выдерживают 20-30 минут при температуре от +25 до +37°C, затем в течение 1 часа отмывают в 2 сменах 0,01 М фосфатно-буферного раствора (рН 7,2-7,4), осторожно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. После такой подготовки препараты-отпечатки вполне готовы для исследования.

Примечание: Указанное на этикетке «рабочее разведение» ДАФИ установлено на день выпуска препарата и определяется по мере хранения через каждые 3 месяца или при возникающей в этом надобности в связи с возможностью снижения препаратом активности. «Рабочее разведение» указывает во сколько раз надлежит развести 1 мл основного разведения ДАФИ, чтобы его раствор был годен к использованию в работе. Указанное на этикетке «рабочее разведение» в 2-3 раза более концентрированное, в сравнении с «красящим титром». Красящий титр - максимальное разведение исходного разведения ДАФИ, сообщающее рабическому антигену в препаратах отпечатках, специфическое свечение интенсивностью в 3-4 креста.

При установлении «красящего титра» раствора ДАФИ препараты-отпечатки из мозга животных (кроликов, морских свинок, белых мышей), павших от фиксированного вируса бешенства, красят в течение 30 минут при +37°C.

Микроскопия проводится с помощью люминесцентного микроскопа любого типа- МЛ-1, МЛ-2, МЛ-4 и др. с возбуждающими фильтрами ЖС-18 + ЖЗС-19. Препараты просматривают под иммерсией. При этом используют нелюминесцирующее масло. Учитывают результаты визуально на основе оценки интенсивности

свечения и морфологических особенностей светящегося комплекса «антиген-антитело».

Обычно наблюдают следующую картину: непораженная вирусом бешенства свежая незагнившая мозговая нервная ткань (свободная от рабического антигена) светится тусклым серовато-желтым или слегка зеленоватым цветом: интенсивно светящихся желто-зеленых гранул и «песчинок» нет. В препаратах, содержащих антиген вируса бешенства, наблюдаются разной величины и формы гранулы (в нейронах и вне клеток), которые желто-зеленые интенсивно светятся. Их величина колеблется от едва заметных в виде «песчинок» образований до 15 -20 микронов. Чаще отмечается обилие очень мелких «песок» ярко желто-зеленых частиц, размером до 1 микрона, реже выявляются более крупные гранулы- до 4 микронов округлой и овальной формы; и еще более крупные (6-15 микронов) округлые или овальные включения.

Интенсивность свечения оценивают в крестах:

- «4+» - яркая, светящаяся желто-зеленая люминесценция гранул и мельчайших точек-песчинок;
- «3+» - отчетливо выраженная достаточно яркая желто-зеленая люминесценция гранул и мельчайших точек;
- «2+» - неяркая люминесценция желтого цвета;
- «1+» - слабая люминесценция, обнаруживаемая только в крупных включениях, желто-серого цвета;
- «-» - отсутствие специфической люминесценции.

Диагноз на бешенство считается установленным, если в нескольких полях зрения микроскопа обнаруживается достаточное количество (не менее 10) типичных гранул (мелких, средних или крупных) или - скоплений групп мельчайших точек («песок») в нервных клетках или вне их, с ярким желто-зеленым свечением, при условии отсутствия в контроле подобных светящихся гранул.

При отрицательном диагнозе на бешенство, устанавливаемом методом иммунолюминесцентной микроскопии, ставят биопробу на молодых белых мышах, согласно существующих наставлений, мозг от погибших мышей исследуют методами иммунолюминесцентной микроскопии или РП в агаровом геле.

Достижение положительного эффекта при диагностике бешенства прямым методом иммунолюминесцентной микроскопии с применением антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина, полученного по предлагаемой методике, подтверждена более чем в 150 исследованиях препаратов головного мозга лабораторных, сельскохозяйственных и диких животных. При этом была установлена высокая диагностическая активность «ИДАФ», превышающая активность аналогичного коммерческого препарата.

Метод прямой иммунолюминесцентной микроскопии с использованием ИДАФ обладает высокой диагностической чувствительностью и моноспецифичностью, позволяет выявлять минимальные количества рабического антигена,

независимо от того, что связан он с живым или вполне инактивированным вирусом бешенства.

Эффективность способа заключается в получении высокоактивного флуоресцирующего антирабического иммуноглобулина без использования тканевого антигена и позволяющий изготовить сравнительно дешевый и эффективный диагностический препарат «ИДАФ».

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ получения иммуноглобулина диагностического антирабического флуоресцирующего, включающий получение рабического антигена, иммунизацию продуцентов рабическим антигеном, получение антирабической

сыворотки и выделение иммуноглобулина, конъюгацию антител с флуорохромом с последующей очисткой целевого продукта от несвязавшегося красителя, *отличающийся* тем, что осуществляют выращивание аттенуированного фиксированного референс-штамма вируса бешенства "CVS-11" в культуре клеток E.derm на жидкой питательной среде Игла MEM с добавлением 10% по объему сыворотку крови КРС, рН 7,5-7,6, в течение 4-5 суток, получают вирусосодержащую суспензию, проводят инактивацию 0,02% этиленимином, добавляют масляный адъювант Монтанид, перемешивают 1000 оборотов в течение 3 мин, полученным антигеном осуществляют иммунизацию продуцентов.