

новости, мнения, обучение. – 2016. - №1. – С. 37-43.

8.Онищенко, Г.Г. Современное состояние коллекционной деятельности связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I-II патогенности / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев, А.В. Топорков

и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. - №1. – С. 5-10.

9.Родионов, А.П. Эпизоотическая характеристика стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов в Республике Татарстан / А.П. Родионов, Е.А. Артемьева, Л.А. Мельникова и др. // Ветеринарный врач. – 2021. - №1. –С.50-55.

УДК: 619:616-097:57.088.1

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.2.16

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

Ахмадеев Р. М.1 – ведущий научный сотрудник (0000-0002-1732-6977), Галеева А. Г.1 – старший научный сотрудник (0000-0003-2650-6459), Арсланова А. Ф.1 – старший научный сотрудник, Ефимова М. А.1,3 – ведущий научный сотрудник (0000-0001-8786-1310), Насыров Ш. М.1 – ведущий научный сотрудник, Кашеваров Г. С.1 – старший научный сотрудник, Яруллин А. И.1 – старший научный сотрудник, Сальников В. В.2 – заведующий лабораторией (0000-0002-2367-672X) 1 – ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань; 2 – Казанский институт биохимии и биофизики (КИББ) ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань; 3 – ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана», г. Казань

Ключевые слова: бешенство, дот-иммуноанализ, иммуноферментный анализ, коллоидное золото. **Key words:** rabies, dot immunoassay, ELISA, colloidal gold



РЕФЕРАТ

Целью исследований явилась разработка прямого дот-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране (НЦМ) с использованием конъюгата на основе коллоидного золота для качественного определения наличия антигена вируса бешенства в патологическом материале. В качестве исследуемых образцов использовали пробы головного мозга (ГМ) разных видов животных, явившиеся положительными при первичном исследовании методами флуоресцирующих антител: лисиц и мышей. РИФ и непрямой «сэндвич»-ИФА (иммуноферментный анализ) проводили с использованием диагностических наборов изготовленных в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В материалах представлены результаты первичных лабораторных испытаний тест-системы для индикации рабического антигена на основе прямого дот-иммуноанализа (ДИА) 81 образца патологического материала, головного мозга разных видов животных. Показано, что ДИА обладает 100% специфичностью, а его оптические сигналы коррелируют с результатами непрямого ИФА. Предложенный метод ДИА, помимо самостоятельного применения, может также послужить базисом для конструирования тест-систем на основе иммунохимического анализа (ИХА).

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что бешенство является одной из древнейших известных человечеству нейровирусных инфекций, и на колоссальный прогресс в области изучения биологии патогена и разработки диагностических и терапевтических стратегий, специфический рабический энцефалит по-прежнему остаётся неизлечимым летальным заболеванием [7]. Одной из основных причин глобальной гиподиагностики бешенства является недостаток точных и простых в эксплуатации диагностических средств [6]. Более того, на начальных этапах манифестации клинические признаки лиссавирусной энцефалопатии зачастую неспецифичны, особенно при отсутствии анамнестических данных, что создаёт дополнительные диагностические трудности для врачей из малоэндемичных регионов.

Важное значение для своевременного проведения комплекса противоэпизоотических и профилактических мероприятий имеет время выявления вируса бешенства. Для обнаружения вируса бешенства и его антигенов в патологическом материале применяется спектр классических методик: (РИФ), (ИФА), биопроба, реакция диффузной преципитации (РДП), иммуногистохимический анализ (ИГХА), а также молекулярно-генетические методы (ОТ-ПЦР), однако большинство из них требует дорогостоящей инструментальной базы, определённой квалификации оператора либо экономических затрат на содержание лабораторных животных [4]. В связи с недостаточным материальным оснащением первичных учреждений ветеринарной службы существует необходимость их оснащения надёжными и недорогими диагностическими тестами, позволяющими облегчить проведение предварительного тестирования.

Одним из наиболее перспективных рутинных серологических методов представляется дот-иммуноанализ (ДИА) – простой и высоковоспроизводимый безинструментальный метод, позволяющий ускорить потоковую диагностику в полевых условиях. Этапы данного исследова-

ния значительно упрощены по сравнению с другими типами иммуноанализа и с учётом пробоподготовки занимают не более 3 часов.

Отечественными авторами описан способ конструирования диагностикума для обнаружения титра антирабических антител в ДИА на основе гликопротеида и наночастиц коллоидного золота [5]. Однако в повсеместную лабораторную практику подобные диагностикумы на сегодняшний день не внедрены. В этой связи особый интерес представляют разработка и оценка диагностической эффективности тест-системы на основе дот-иммуноанализа как экспрессного, чувствительного и специфичного теста для посмертной диагностики бешенства у животных. Диагностические свойства подобных систем, в свою очередь, напрямую зависят от степени очистки комплектующих компонентов – контрольных антигенов и антирабических иммуноглобулинов [8, 10].

Целью данного исследования явилось получение конъюгата антирабических иммуноглобулинов на основе наночастиц коллоидного золота и определение его диагностической эффективности в дот-иммуноанализе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез наночастиц коллоидного золота. Получение наночастиц КЗ с диаметром 17 нм осуществлялось по модифицированному методу Френса. Для этого в колбе Эрленмейера вместимостью 250 мл на магнитной мешалке доводили до кипения 48 мл mQ-воды, подключали обратный холодильник и добавляли стеклянной пипеткой 0,5 мл 1% раствор золотохлористоводородной кислоты (ООО «Аурат», Россия) и кипятили в течение 2 минут. Далее в реакционную смесь стеклянной пипеткой вносили 1,5 мл 1% раствора цитрата натрия, увеличивали до максимума обороты мешалки и кипятили в течение 20 минут. Об образовании коллоида судили по приобретению раствором в течение 1-3 минут ярко-красной окраски с пурпурным оттенком, усиливающейся по мере увеличения размера ча-

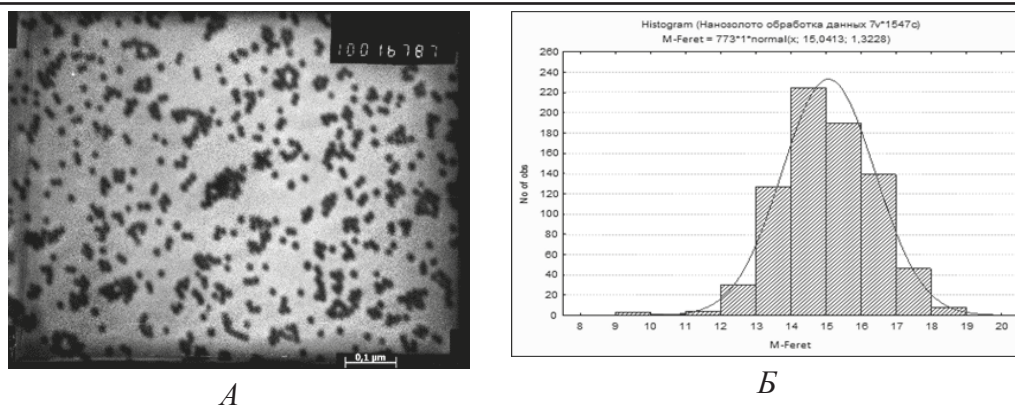


Рис. 1. Результаты электронной микроскопии: А – микрофотография наночастиц КЗ диаметром 15 нм (риска 100 нм); Б – гистограмма распределения размеров наночастиц КЗ в образце

Таблица 1
Сравнительная оценка диагностической эффективности методов ДИА и нИФА

Наименование проб	нИФА+, ДИА+	нИФА+, ДИА–
ГМ лисиц (n=6)	2/6	0/6
ГМ мышей, заражённых ВБ (n=40)	40/40	0/40
ГМ мышей, заражённых ВБА (n=10)	0/10	0/10
ГМ интактных мышей (n=20)	0/20	0/20
Контрольный положительный антиген (n=5)	5/5	0/5

Таблица 2
Соответствие уровней интенсивности окраски образцов в ДИА результатам нИФА

Интенсивность оптического сигнала в ДИА	Диапазон OD в нИФА, ОУ (M±m)	K _{сп} (M±m)
++++	1,237±0,032...0,801±0,013	2,3±0,07
+++	0,734±0,019...0,632±0,024	2,26±0,04
++	0,416±0,02...0,209±0,018	2,51±0,09
+	0,189±0,009...0,115±0,008	2,17±0,08
–	0,087±0,004...0,099±0,007	≤2,0

стиц. После прекращения кипения раствор переливали в стерильную колбу, подогретую в сушильном шкафу; коллоид хранили в темноте при +4°C.

Получение конъюгатов на основе КЗ. Конъюгацию наночастиц КЗ с овечьими антирабическими иммуноглобулинами проводили методом нековалентной (адсорбционной) конъюгации по методике Дыкмана Л. А. [2, 3]. Перед конъюга-

цией иммуноглобулины подвергали диализу против 1000-кратного избытка 10 мМ карбонатного буфера (рН = 9,0) в течение 2 часов при +4°C. Раствор 0,1 М карбоната калия добавляли к коллоидному золоту (ОП520 = 1,0) до достижения рН 9,0 и вносили в раствор иммуноглобулины с концентрацией 1,0±0,14 мг/мл. Смесь инкубировали 2 часа при комнатной температуре в условиях мягкого пе-

ремешивания, после чего в качестве стабилизатора вносили БСА до конечной концентрации 0,5%. Наночастицы КЗ с иммобилизованным белком отделяли от непрореагировавшего белка центрифугированием при 10,000 rpm в течение 15 минут; после удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 10 мМ трис-НСl буфере (pH = 9,0), содержащем 0,1% БСА и 0,1% азида натрия. О стабильности конъюгата судили по сохранению характерной окраски и отсутствию признаков флоккуляции.

Электронная микроскопия наночастиц КЗ. Электронная микроскопия наночастиц коллоидного золота. Образцы коллоидного раствора наносили на медные сетки для электронной микроскопии с подложкой и высушивали. Съёмку наночастиц осуществляли в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100 CX-II на увеличении от 48000 до 100000, после чего негативы оцифровывали и измерение размеров частиц проводили, используя программу ImageJ (FII). Измеряли все частицы, индивидуально обнаруживаемые в зрительном поле (при условии, что периметр частицы просматривался по всей длине и не формировал слитный силуэт с соседней частицей). Рассчитывали размеры частиц и коэффициент сферичности; последний определяли по формуле:

$$C=4\pi(S/P^2) \quad (1),$$

где С – коэффициент сферичности;

S – площадь;

P – периметр.

Пробоподготовка. В качестве исследуемых образцов использовали пробы головного мозга (ГМ) разных видов животных, явившиеся положительными при первичном исследовании методами флуоресцирующих антител и биопробы: лис, отстрелянных на территории Республики Татарстан в рамках эпизоотического мониторинга бешенства в 2016-2018 гг. (n=6) и мышей (n=40), экспериментально заражённых вирусом бешенства (штамм «Овечий», ГНКИ, коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», инфекционный титр

не менее 6,12 lg LD50/мл). Из головного мозга готовилась 10% суспензия на PBS; инаktivация производилась 0,025 % β-пропиолактоном («Sigma Aldrich», США). В качестве контрольных положительных образцов (n=5) использовали высокоочищенный монофракционный рабический антиген, выделенный ранее описанным способом [8].

Проведение дот-иммуноанализа. В качестве основы для проведения дот-иммуноанализа использовались нитроцеллюлозные мембраны «Immobilon-NC Membrane» («Millipore», «Merck», Германия) с диаметром пор 0,45 мкм, разделённые на квадраты площадью 1 см2 и предварительно сенсibilизированные овечьими антирабическими иммуноглобулинами. Опытные образцы наносились на сухую мембрану в объёме 2-2,5 мкл на точку с дальнейшим высушиванием в течение 30 минут. Для исключения неспецифических связываний высушенные мембраны инкубировали в блокирующем растворе (5% сухого обезжиренного молока в фосфатно-буферном растворе) в течение 1 часа, отмывали 2-3 раза в фосфатно-буферном растворе с твином и высушивали при комнатной температуре (24±0,5) °C. Инкубацию мембраны в растворе конъюгата на основе КЗ (1:1600) осуществляли в течение 40 минут. По истечении срока инкубации мембрану промывали в цитратном буфере (pH = 3,7); реакцию останавливали погружением мембраны на 5 минут в раствор гипосульфита натрия, после чего дважды промывали дистиллированной водой и подсушивали на воздухе. Регистрацию результатов осуществляли визуально.

Валидация результатов. О специфичности дот-иммуноанализа судили по количеству совпадений отрицательных результатов (в процентном отношении) тестирования образцов с результатами их исследования в непрямом ИФА и РИФ. Для оценки специфичности в исследуемую панель были включены 20 образцов, в которых вирусный антиген не был выявлен ни одним из вышеперечисленных методов, а также 10 образцов, получен-

ных из головного мозга мышей, экспериментально заражённых эпизоотическим штаммом вируса болезни Ауески «Арский» (инфекционный титр 3 lg LD50/0,03 мл).

Статистическая обработка данных. Эксперименты были проведены в 3-8 повторях. Статистическую обработку результатов производили в программе «Statistica» с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в качестве критерия достоверности. При этом за достоверный уровень значимости принимали $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При синтезе наночастиц с установленным размером в качестве контрольного метода использовали электронную микроскопию, подтвердившую размер и гомогенность получаемых частиц (рисунок 1 А, Б). Суммарно методами ДИА, нИФА, РИФ и биопробы был протестирован 81 образец головного мозга двух видов животных, среди которых присутствовали пробы, содержащие антиген вируса бешенства (ВБ), антиген вируса болезни Ауески (ВБА) (гетерологичный антиген), а также пробы головного мозга интактных мышей. По результатам постановки реакции было установлено, что во всех образцах, оказавшихся положительными в РИФ, а также дающих оптическую плотность в нИФА с коэффициентом специфичности (Ксп) не менее 2,5, на мембране формировались красные пятна разной степени интенсивности, оцениваемые по 4-кростовой системе. В отрицательном контроле, а также в образцах, содержащих гетерологичный антиген, окраски не наблюдалось.

Следующим этапом исследования явилась оценка сопоставимости результатов ДИА с конъюгатом на основе коллоидного золота с результатами нИФА (табл. 1). Из данных таблицы 1 видно, что 100% проб демонстрировали сопоставимость между нИФА и ДИА. Так, при исследовании проб головного мозга лисиц рабического антигена был обнаружен методами РИФ, нИФА и биопробы в 2 образцах из 6, что было подтверждено в ДИА. Ранее при постановке нами ДИА с использова-

нием пероксидазного конъюгата, который, как известно, обладает меньшей чувствительностью, нами было обнаружено, что пробы, являвшиеся слабоположительными в ИФА (Ксп = 2,1), оказались негативными в ДИА [1], однако использование конъюгата на основе коллоидного золота позволяет достичь полной сопоставимости результатов (табл. 2). Данные, представленные в таблице 2, показывают, что различий в результатах ДИА и нИФА обнаружено не было. Время, затраченное на постановку ДИА, с учётом пробоподготовки составило не более 3 часов; воспроизводимость результатов достигала 100%. Таким образом, предлагаемая тест-система удовлетворяет практическим требованиям при экспрессной диагностике бешенства в условиях недостаточной оснащённости.

ВЫВОДЫ

Описанный вариант постановки ДИА на НЦМ с использованием иммуноглобулинов, полученных на мономерный гликопротеин вируса бешенства, является быстрым и простым диагностическим тестом, предназначенным для проведения в полевых условиях. Результаты показывают, что подобный формат теста способен детектировать целевой антиген в образцах головного мозга инфицированных животных, при этом образцы не требуют дополнительной очистки – допускается использование первичного тканевого гомогената. Кроме того, метод обладает достаточной чувствительностью для обнаружения антигена в 10-кратно разбавленных гомогенатах, что учитывает количественный разброс в тех случаях, когда точное дозирование тканевых образцов может быть недоступно.

Предложенный методический подход, помимо самостоятельного применения, может также послужить базисом для конструирования тест-систем на основе ИХА, позволяющих произвести диагностическую процедуру с количественным учётом в значительно меньшие сроки.

APPLICATION OF CONJUGATE BASED ON COLLOIDAL GOLD FOR EXPRESS DIAGNOSTICS OF RABIES IN DOT IM-

MUNOANALYSIS. Akhmadeev R. M.1 – leading researcher, Candidate in Veterinary sciences, Galeeva A. G.1 – senior researcher, Candidate in Veterinary sciences, Arslanova A. F.1 – Candidate in Veterinary sciences, Efimova M. A.1,3 – Doctor in Biological sciences, Nasyrov Sh. M.1 – Candidate in Veterinary sciences, Kashevarov G. S.1 – Candidate in Biological sciences, Yarullin A. I.1 – Candidate in Biological sciences, Salnikov V. V.2 – Doctor in Biological sciences. 1 – Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan. 2 – Federal Research Center «Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences», Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan. 3 – Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman, Kazan.

ABSTRACT

The aim of the research was to develop a direct dot-immunoassay on a nitrocellulose membrane (NCM) using a conjugate based on colloidal gold for the qualitative determination of the presence of rabies virus antigen in pathological material. As the test samples, we used brain samples of various animal species, which were positive during the initial study by methods of fluorescent antibodies: foxes and mice. IFA and indirect ELISA carried out using diagnostic kits manufactured at the Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety. The materials present the results of primary laboratory tests of the test system for the indication of rabies antigen based on direct dot-immunoassay (DIA) 81 samples of pathological material, the brain of various animal species. It was shown that DIA has 100% specificity, and its optical signals correlate with the results of indirect ELISA. The proposed DIA method, in addition to independent application, can also serve as a basis for the design of test systems based on immunochemical analysis.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ахмадеев, Р. М. Получение антигена вируса бешенства методом трёхфазной экстракции / Р. М. Ахмадеев, А. Г. Мухамеджанова, Н. Р. Мифтахов и др. // Ветеринарный врач. – 2020. – № 5. – С. 26-33. <https://doi.org/10.33632/1998-698X.2020-5-26-33>

2. Ахмадеев, Р. М. Применение дот-иммуноанализа для индикации рабического

антигена в патологическом материале / Р. М. Ахмадеев, А. Ф. Арсланова, Н. Р. Мифтахов, Ш. М. Насыров, М. А. Ефимова, И. И. Самерханов // Ветеринарная патология. – 2021. – № 2. – С. 21-27.

3. Богатырёв, В. А. Методы синтеза наночастиц с плазмонным резонансом / В. А. Богатырёв, Л. А. Дыкман, Н. Г. Хлебцов // Учебное пособие. – СГУ им. Н. Г. Чернышевского. – 2009. – 35 с.

4. Ефимова, М. А. Оценка пригодности выделенных антирабических иммуноглобулинов для методов лабораторной диагностики: ИФА и МФА / М. А. Ефимова, А. Г. Мухамеджанова, А. Н. Чернов и др. // Ветеринарный врач. – 2018. – № 4. – С. 3-7.

5. Загоскина, Т. Ю. Дот-иммуноанализ с использованием антител, меченных наночастицами коллоидного золота, для детекции ботулинического токсина в клиническом материале и пищевых продуктах / Т. Ю. Загоскина, Е. Л. Чапоргина, Е. Ю. Марков и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2017. – № 4. – С. 31-35.

6. Недосеков, В. В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства / В. В. Недосеков // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 41-47.

7. Шарапова, Н. А. Выделение гликопротеида из фиксированного штамма вируса бешенства «Москва 2532» и конструирование на его основе диагностикума для дот-иммуноанализа / Н. А. Шарапова, М. Н. Киреев, Е. Г. Абрамова и др. // Бюллетень ВНИЦ СО РАМН. – 2012. – № 5 (87), 1. – С. 347-350.

8. Léchenne, M. Validation of a Rapid Rabies Diagnostic Tool for Field Surveillance in Developing Countries / M. Léchenne, K. Naïssengar, A. Lepelletier, I. O. Alfaroukh, H. Bourhy // PLoS Negl Trop Dis. – 2016. – 10(10):e0005010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005010>.

9. Mahadevan, A. Perspectives in Diagnosis and Treatment of Rabies Viral Encephalitis / A. Mahadevan, M. S. Suja, R. S. Mani, S. K. Shankar // Insights from Pathogenesis. Neurotherapeutics. – 2016. – 13(3). – P. 477-92. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0452-4>.

10. Nadyrova, A. I. Obtaining rabies virus purified antigen / A. I. Nadyrova, M. A. Efimova, A. G. Mukhamedzhanova et al. // Asian Journal of Pharmaceutics. – 2018. – № 12 (4). – P. 1299-1303.