

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии физиологии растений

**ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА В ПРОИЗВОДСТВЕ
ПРЕПАРАТА ОТ БЕШЕНСТВА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 3 курса 331 группы
направления подготовки магистратуры 06.04.01 Общая биология
биологического факультета
Перевозникова Дмитрия Александровича

Научный руководитель

д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25

Д.В. Уткин

Научный консультант

вед. науч. сотр., канд. биол. наук

СВ 26.11.25

С.В. Генералов

Зав. кафедрой

д-р биол. наук, доц.

УМ 26.11.25

Д.В. Уткин

Саратов 2025

Введение. Бешенство — острая зоонозная инфекция с почти стопроцентной летальностью на стадии клинических проявлений [1–2]. В постконтактной профилактике решающее значение имеет пассивная иммунизация, обеспечивающая мгновенную защиту до формирования собственного антительного ответа после вакцинации [3–4]. Ключевым показателем качества антирабического иммуноглобулина является его специфическая активность — способность антител нейтрализовать вирус, выражаемая в МЕ/мл [5]. В соответствии с фармакопейными нормативами активность препарата должна быть не ниже 150 МЕ/мл, что определяет минимально допустимый уровень для клинического применения [6].

Цель и задачи исследования. Целью данной работы стала оценка специфической активности антирабического иммуноглобулина, применяемого в производстве препарата против бешенства.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Охарактеризовать метод FAVN и его модификации, применяемые для оценки вируснейтрализующей активности антирабического иммуноглобулина, и определить их преимущества по сравнению с классическими *in vivo*-методами.
2. Выполнить экспериментальное исследование специфической активности антирабического иммуноглобулина по модифицированному FAVN-тесту с использованием клеточной культуры Vero и штамма вируса бешенства «Саратов».
3. Оценить аналитические характеристики использованной методики, включая линейность и воспроизводимость, и определить её соответствие требованиям валидации, предъявляемым к методам контроля качества иммунобиологических препаратов.

Материалы и методы. В работе использовали клеточную линию Vero, применяемую для серологических тестов по определению чувствительности к

вирусу бешенства *in vitro* [5]. Клетки культивировали в среде 199 с 10% фетальной сыворотки КРС; перед экспериментами культура проверялась на отсутствие микоплазм при пороге не менее 95% [3]. Вирусным агентом служил культуральный штамм вируса бешенства «Саратов» (№1400), происходящий от штамма «Москва 3253 Vero» и рекомендованный для клеточных методов оценки антирабических препаратов [5]. Рабочая инфекционная доза составляла 100–300 ИД₅₀ на лунку, что соответствует модифицированным вариантам FAVN-теста [4]. Объектами исследования выступали промышленный антирабический иммуноглобулин и стандартный образец (188 МЕ/мл).

Методика. Специфическую активность АИГ определяли по модифицированному FAVN-тесту [4,5], обеспечивающему высокую воспроизводимость и чёткую визуализацию фокусов флуоресценции, а также сокращение времени анализа до 72 часов. Параметр «линейность» оценивали в соответствии с ОФС 1.1.0012 [7] с использованием модельных смесей различной активности. Титры вируснейтрализующих антител рассчитывали методом Рида–Менча [3] с последующим определением специфической активности образцов.

Структура работы. Работа изложена на 70 страницах, включает введение, две главы литературного обзора, две главы собственных исследований, заключение, выводы и список из 42 источников. Представлено 5 таблиц и 9 рисунков.

Научная новизна. Для производственного контроля антирабического иммуноглобулина применена модифицированная методика FAVN-теста [5], при этом экспериментально подтверждена высокая линейность метода ($R^2 = 0,997$) [7].

Научная значимость. Методика способствует внедрению быстрых, воспроизводимых и этически приемлемых клеточных технологий контроля АИГ, повышая эффективность и стандартизированность оценки его специфической активности.

Основное содержание работы. В главе «Основная часть» представлен развернутый аналитический обзор современных научных данных, посвящённых вирусу бешенства, его таксономической классификации, структурно-морфологическим особенностям и эволюционным предпосылкам формирования его выраженного нейротропизма. Rabies virus, относящийся к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*, характеризуется пулевидной формой вириона, спиральным типом нуклеокапсида и значительной консервативностью генома, что обуславливает устойчивость основных патобиологических свойств возбудителя. В работе подчёркнуто, что глубокое понимание морфологии, структуры гликопротеинов и механизмов взаимодействия вируса с клетками-мишенями имеет ключевое значение для разработки и совершенствования диагностических платформ, методов профилактики и тест-систем для контроля качества антирабических иммунобиологических препаратов.

В обзоре последовательно рассмотрены эпидемиологические особенности циркуляции вируса бешенства в природных и антропоургических очагах, анализируются пути передачи инфекции, включая трансмиссивные, а также контактные и аэрозольные механизмы, описанные в ряде эпидемических наблюдений. Отдельное внимание уделено факторам риска заражения пациентов в условиях эндемичных регионов, а также биологическим предпосылкам высоких показателей летальности, которые, несмотря на значительный прогресс медицины, остаются близкими к 100% при развитии клинической стадии заболевания. Детально отражены особенности патогенеза, основанные на ретроградном аксональном транспорте вируса от периферических нервных окончаний к центральной нервной системе, что обеспечивает постепенное развитие симптомов, от продромального периода до тяжёлых поражений стволовых структур. Нейротропизм Rabies virus обуславливает характерную клиническую картину — гидрофобию, судороги, психомоторное возбуждение и последующее угнетение жизненно важных

функций, что подтверждается многолетними наблюдениями и фундаментальными исследованиями нейровирулентности вируса.

Современные подходы к лабораторной диагностике включают молекулярные тесты (RT-PCR), серологические методы (RFFIT, FAVN-тест), а также культуральные методы выделения вируса. Подчёркивается, что наличие разнообразных диагностических платформ даёт возможность не только своевременно выявлять инфекцию, но и обеспечивать строгий контроль качества иммунобиологических препаратов, предназначенных для профилактики заболевания. К числу таких средств относится антирабический иммуноглобулин (АИГ), обеспечивающий пассивную защиту в период, предшествующий формированию полноценного адаптивного иммунного ответа. Применение АИГ остаётся обязательным элементом комбинированной профилактики при тяжёлых и множественных укусах животных, подозрительных на бешенство, что подчёркивается рекомендациями ВОЗ и рядом современных публикаций.

Особое внимание в работе уделено необходимости строгого контроля специфической вируснейтрализующей активности АИГ на этапе производства. Этот показатель отражает способность препарата нейтрализовать инфекционный вирус, тем самым обеспечивая защиту реципиента в первые критические дни после инфицирования, когда иммунная система ещё не сформировала достаточный уровень собственных антител. Значимость данного параметра подтверждена исследованиями, проводимыми в ведущих вирусологических центрах, включая ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб”», где разработаны и внедрены клеточные методы для экспресс-оценки активности АИГ.

В главе «Результаты исследования» представлено детальное изложение экспериментальных данных, полученных при изучении специфической активности АИГ, произведённого на основе гетерологичного сырья. Методологической основой исследования стала модифицированная реакция вируснейтрализации на культуре клеток Vero, разработанная на базе

адаптированного варианта FAVN-теста. Данная методика ранее была валидирована по ряду показателей и зарекомендовала себя как воспроизводимая и чувствительная система контроля биологических препаратов (Генералов и соавт., 2025) .

Использование клеточной линии Vero в сочетании с культурально адаптированным штаммом вируса бешенства «Саратов» обеспечило равномерность заражения клеточного монослоя и более выраженную флуоресценцию при последующем окрашивании иммунофлуоресцентным конъюгатом «Флураб». Эти особенности значительно повысили качество визуальной регистрации результатов и снизили вариабельность между повторностями. Разработанная схема разведения иммуноглобулина (пошаговое добавление 100–20 мкл АИГ в отдельные сектора планшета) позволила воспроизвести градиент концентраций, необходимый для точного определения вируснейтрализующей активности в соответствии с требованиями валидации метода по показателю «линейность» .

Процедурная схема эксперимента включала подготовку модельных серийных разведений АИГ, инкубацию с вирусом бешенства в течение 1 часа при 37 °С, последующее внесение клеток Vero в концентрации 10^5 клеток/мл и инкубацию в CO₂-инкубаторе в течение 72 часов. После окончания инкубации клетки фиксировали и окрашивали препаратом «Флураб», что позволило визуально идентифицировать фокусы флуоресценции — маркеры продукции вирусного антигена. Регистрация результатов проводилась с использованием люминесцентного микроскопа «Микромед И ЛЮМ», обеспечивающего высокую чувствительность и стабильность визуализации.

Количественный расчёт титров антител осуществляли по методу Рида и Менча, что позволило привести полученные данные в сопоставимый формат относительно используемого стандартного образца предприятия (СОП) активностью ($180,8 \pm 18,8$) МЕ/мл. Исследуемые образцы продемонстрировали специфическую активность в диапазоне 113–188 МЕ/мл, что соответствует требованиям к готовому препарату. При анализе широкого диапазона

концентраций (37–188 МЕ/мл) коэффициент детерминации составил $R^2 = 0,91$, что отображает достоверную корреляцию между концентрацией антител и наблюдаемым титром. Однако, как подчёркивают Генералов и соавт. (2025), подобная величина является недостаточной для валидации метода в условиях расширенной аналитической области, особенно при использовании результатов для выпуска лекарственного препарата.

В связи с этим особую значимость приобрёл анализ линейности в узком диапазоне 110–188 МЕ/мл, соответствующем фармакопейным требованиям 80–120% от номинального значения активности (150 МЕ/мл). В данном диапазоне коэффициент аппроксимации составил $R^2 = 0,997$, что свидетельствует о практически идеальной линейной зависимости. Это подтверждает корректность функционирования системы в условиях, максимально приближенных к рутинному производственному контролю. Таким образом, модифицированная клеточная методика полностью отвечает требованиям по показателю «линейность» и может быть рекомендована для применения в системе контроля качества АИГ на фармацевтических предприятиях.

ВЫВОДЫ

1. Специфическая активность антирабического иммуноглобулина (АИГ) подтверждена как основной функциональный показатель, определяющий способность препарата обеспечивать экстренную профилактику бешенства. Установлено, что вируснейтрализующая активность антител является ключевым критерием терапевтической эффективности и служит нормативным параметром контроля качества в процессе производства.

2. Показано, что специфическая активность АИГ воспроизводимо определяется в условиях модифицированной клеточной реакции нейтрализации. Метод обеспечивает объективную оценку количества активных антител, способных блокировать вирус штамма «Саратов». Выявлена чёткая зависимость между концентрацией иммуноглобулина и

степенью подавления вирусной инфекции в культуре Vero: отсутствие флуоресцентных фокусов свидетельствует о полной нейтрализации.

3. Стандартный образец предприятия (188 МЕ/мл) подтвердил стабильность и воспроизводимость результатов при повторном титровании. Последовательные разведения и трёхкратное титрование выявили устойчивую корреляцию между вводимой концентрацией и наблюдаемой вируснейтрализующей активностью, что подтверждает корректность выбранного аналитического подхода и его пригодность для серийного контроля.

4. В ходе исследования параметра «линейность» в соответствии с ОФС 1.1.0012 установлено, что в широком диапазоне 37–188 МЕ/мл линейность умеренная ($R^2 = 0,91$), что типично для биологических систем. Однако в нормативно значимом диапазоне 113–188 МЕ/мл величина $R^2 = 0,997$ демонстрирует практически идеальную линейность, подтверждая способность метода надёжно определять специфическую активность АИГ в зоне, критичной для выпуска препарата.

5. Метод обладает высокой чувствительностью именно к функциональной активности антител, позволяя выявлять минимальные изменения их вируснейтрализующей способности. Это определяет его значимость для мониторинга стабильности промежуточных фракций, контроля возможной деградации антител и оценки влияния производственных этапов на сохранность активности.

6. Качественные результаты иммунофлуоресценции подтверждают количественные данные: при высокой специфической активности АИГ флуоресцентные фокусы отсутствуют, тогда как снижение активности сопровождается мозаичным свечением инфицированных клеток. Визуальная компонента усиливает достоверность анализа и соответствует требованиям комбинированных биологических методов.

7. Проведённое исследование показало, что специфическая активность АИГ остаётся стабильной в технологически значимых пределах и не зависит от кратности исходных разведений, применяемых при титровании. Это согласуется с методологией модифицированного FAVN-теста и подтверждает универсальность и надёжность использованного подхода.

8. Модифицированный FAVN-тест доказал свою научную и технологическую состоятельность как метод определения специфической активности АИГ. К его преимуществам относятся высокая аналитическая точность, селективность к вируснейтрализующим антителам, воспроизводимость, сокращение срока получения результатов до 72 часов и отказ от использования лабораторных животных, что повышает этическую приемлемость метода.

9. Итоговая оценка специфической активности АИГ в условиях валидированной методики показывает, что препарат соответствует установленным требованиям и обладает достаточной вируснейтрализующей способностью для применения в клинической практике. Метод может быть рекомендован в качестве основного инструмента стандартизации и контроля качества антирабического иммуноглобулина на производстве.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Smith, J. S. Rabies / J. S. Smith, A. A. King // Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. – 10th ed. – London: Hodder Arnold, 2005. – P. 1234.
- 2 World Health Organization. Rabies vaccines: WHO position paper // Weekly Epidemiological Record. – 2018. – No. 93. – P. 201–220.
- 3 Hampson, K. Estimating the global burden of endemic canine rabies / K. Hampson [et al.] // PLOS Neglected Tropical Diseases. – 2015. – Vol. 9, No. 4.
- 4 Warrell, M. J. Rabies and other lyssavirus infections / M. J. Warrell, D. A. Warrell // The Lancet. – 2004. – Vol. 363, No. 9413. – P. 959–969.
- 5 Gogtay, N. J. Human rabies immunoglobulin and monoclonal antibodies: Current perspectives / N. J. Gogtay [et al.] // Clinical Infectious Diseases.

6 Европейская фармакопея. Монография 0156: Иммуноглобулин антирабический. 11-е изд. – Страсбург : EDQM, 2023. – [8] с.

7 Меслин, Ф. Кс. Лабораторные методы исследования бешенства / Ф. Кс. Меслин, М. М. Каплан, Г. Копровски. – 4-е изд. – Женева : ВОЗ, 1996. – 469 с.

 26.11.25