

# ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНА

С.В. Генералов, А.Л. Кравцов, В.А. Кожевников, Ю.К. Гаврилова, Е.Г. Абрамова,  
А.К. Никифоров

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов,  
Россия

**Резюме.** В настоящем исследовании рассматривается разработка метода определения уровня антирабических антител в иммунных сыворотках и препарате иммуноглобулина с использованием проточной цитометрии. Метод основан на измерении уровня флуоресценции в клетках Vero, инкубированных в питательной среде с добавлением смеси разведений антирабических сывороток или препарата иммуноглобулина и аттенуированного штамма вируса бешенства «Москва 3253», адаптированного к репродукции на перевиваемых клеточных линиях. Для определения уровня антител образцы антирабических сывороток и иммуноглобулина следует разводить в солевом растворе соответственно в 20 и 200 раз. При этом рекомендуемая доза вируса должна составлять 0,1 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку. Для фиксации и пермеабилзации клеточной мембраны применяли реагент Cytoperm/Cytofix (BD Pharmingen, США), содержащий формальдегид. Этот компонент способен инактивировать вирус бешенства, что позволяет считать предлагаемый метод соответствующим принципам биологической безопасности. Для окрашивания предлагается использовать конъюгат антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ (ФГБУ ВНИИЗЖ, Россия). Данное обстоятельство не ограничивает применение аналогичных препаратов, предназначенных для этой цели. Цитометрические исследования осуществляли на проточном цитометре, снаряженным аргоновым лазером мощностью 20 МВт, при длине волны эмиссии 488 нм со скоростью 500 клеток в секунду. Инфицированными считали те клетки, значения интенсивности флуоресценции которых составили более 10 условных единиц. Использование проточной цитометрии позволяет определить точное количество инфицированных клеток в исследуемой суспензии, а также степень их инфицирования по интенсивности флуоресценции. Уровень содержания антител в исследуемых образцах учитывают по калибровочному графику, построенному на основании данных исследования стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина, имеющего активность 30 МЕ в 1 мл (NIBSC, Великобритания). Установлена высокая степень корреляции результатов, полученных с помощью предлагаемого метода в сравнении с результатами, полученных и других методов определения активности антирабических препаратов — биологической реакции нейтрализации вируса на белых мышах (0,92) и модифицированного метода FAVN (0,98). При этом сравнение результатов анализа уровня антирабических антител, полученных с применением проточной цитометрии, и результатов, полученными в тестах *in vivo*, проведено впервые. Возможность быстрого

---

**Адрес для переписки:**

Генералов Сергей Вячеславович  
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46,  
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб».  
Тел.: 8 (452) 26-21-31.  
E-mail: svgeneraloff@gmail.com

**Contacts:**

Sergei V. Generalov  
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46,  
Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe".  
Phone: +7 (452) 26-21-31.  
E-mail: svgeneraloff@gmail.com

---

**Библиографическое описание:**

Генералов С.В., Кравцов А.Л., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К.,  
Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. Проточная цитометрия при анализе  
вируснейтрализующей активности антирабических сывороток  
и иммуноглобулина // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 107–114.  
doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-107-114

**Citation:**

Generalov S.V., Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K.,  
Abramova E.G., Nikiforov A.K. Flow cytometry for the analysis  
of virusneutralizing activity of antirabies serum and immunoglobulin drug //  
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019,  
vol. 9, no. 1, pp. 107–114. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-107-114

получения результата, а также точного определения степени инфицирования клеток по интенсивности флуоресценции позволит использовать предлагаемый метод на этапах контроля в производстве разрабатываемых и выпускаемых иммунобиологических антирабических препаратов.

**Ключевые слова:** вирус бешенства, антирабический иммуноглобулин, антирабическая сыворотка, вируснейтрализующая активность, проточная цитометрия, контроль биопрепаратов.

## FLOW CYTOMETRY FOR THE ANALYSIS OF VIRUS NEUTRALIZING ACTIVITY OF ANTIRABIES SERUM AND IMMUNOGLOBULIN DRUG

Generalov S.V., Kravtsov A.L., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Nikiforov A.K.

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Saratov, Russia

**Abstract.** Here, we discuss development of flow cytometry technique for determining level of rabies antibodies in immune sera and immunoglobulin preparations, which is based on measuring fluorescence level in Vero cell line added with a mix of serially diluted anti-rabies serum or immunoglobulin preparation together with Moscow 3253 attenuated rabies virus strain, adapted for reproduction in cell lines. For this, rabies sera and immunoglobulin preparation were diluted 1:20 and 1:200 with PBS, respectively, whereas rabies virus was recommended for use at dose of 0.1 ID<sub>50</sub>/cell. Cell membrane fixation and permeabilization were performed by using a Cytoperm/Cytofix reagent (BD Pharmingen, USA) containing formaldehyde able to inactivate rabies virus, thus complying with biological safety regulations. Anti-rabies FITC-conjugated immunoglobulin (FGBI АРРІАН, Russia) was recommended for staining, that does not limit using similar reagents. Then, a flow cytometer equipped with a 20 mW argon laser (488 nm emission wavelength, throughput — 500 cells per second) was used for analysis. Vero cells displaying a fluorescence intensity exceeding 10 arbitrary units were considered infected. Flow cytometry allows to precisely measure amount of experimental infected cells as well as degree of infection by evaluating cell fluorescence intensity. Amount of antibodies in the samples examined by us was calculated by building a calibration curve based on depicting data for a standard rabies immunoglobulin with activity of 30 IU/ml (NIBSC, Potters Bar, United Kingdom). A high correlation between the data obtained by us and results from other detection methods used to assess activity of anti-rabies preparations such as biological neutralization of rabies virus in white mice (0.92) and modified FAVN test (0.98) was demonstrated. The comparison of the results of the analysis of the level of rabies antibodies obtained using flow cytometry, and the results obtained in tests *in vivo*, was carried out for the first time. Moreover, it is worth noting that for the first time the level of anti-rabies antibodies assessed by flow cytometry and *in vivo* tests was compared. An opportunity to perform rapid and easy-to-do analysis on assessing amount of infected cells by measuring fluorescence intensity in flow cytometry assay would allow to apply this approach for quality control while developing and manufacturing immunobiological anti-rabies preparations.

**Key words:** rabies virus, rabies immunoglobulin, rabies serum, neutralizing activity, flow cytometry, control of biologics.

## Введение

Антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади, используемый для постэкспозиционной профилактики бешенства, в Российской Федерации является одним из самых востребованных из спектра иммунобиологических лекарственных препаратов для профилактики бактериальных и вирусных инфекций. Подобная востребованность вызвана напряженной эпизоотической обстановкой, сохраняющейся в последние десятилетия, и высоким количеством обращающихся за антирабической помощью, которое составляет от 200 до 400 тыс. человек в год [6].

Способность к формированию пассивного иммунитета с момента укуса до начала выработки активного иммунитета (7–8 сут) напрямую связана с одной из важнейших характеристик препарата — специфической (вируснейтрализующей) активностью антирабического иммуноглобулина, которая, согласно требованиям Всемирной орга-

низации здравоохранения (ВОЗ), должна составлять не менее 150 МЕ в 1 мл [14].

В настоящее время при производстве антирабического иммуноглобулина определение специфической активности осуществляют в реакции нейтрализации на белых мышьях [12]. Этот метод является высокочувствительным и рекомендован ВОЗ [14]. С другой стороны, данный метод отличается трудоемкостью и длительностью, поскольку подразумевает интрацеребральное введение смеси вирусосодержащей жидкости и антирабического препарата большому количеству белых мышьях и учет результата в течение 14–21 сут [12].

Альтернативным решением, устраняющим указанные недостатки, является проведение анализа на клеточных культурах с использованием метода иммунофлуоресценции [1, 9]. Основой метода является учет инфицированных вирусом бешенства клеток после окрашивания специфическими флуоресцирующими антителами с помощью люминесцентной микроскопии.

Логичным развитием методических подходов определения специфической активности противовирусных препаратов с помощью люминесцентной микроскопии является использование проточной цитометрии, позволяющей дать более точную оценку количества инфицированных вирусом клеток. В зарубежной литературе описано обнаружение вируса бешенства и определение уровня антирабических антител в крови вакцинированных животных методом проточной цитометрии [10, 13] с применением клеток мышечной нейробластомы (MNA) и почек сирийского хомяка (ВНК-21). Сведения о применении проточной цитометрии для обнаружения вируса бешенства, представленные в отечественной литературе, ограничены только собственными исследованиями [4]. Данные об использовании проточной цитометрии при определении специфической активности антирабических профилактических препаратов на сегодняшний день отсутствуют.

Целью настоящей работы явилась разработка метода, основанного на использовании проточной цитометрии, для определения уровня специфических антител в антирабических сыворотках лошадей и препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного из указанных сывороток.

## Материалы и методы

**Вирусы.** Штаммы фиксированного вируса бешенства «Москва 3253» (номер депозита 61/91, пассаж 3) и CVS (номер депозита 80/06, пассаж 3) получены из коллекции ФГБУ НЦЭСМП (Москва, Россия). Штамм «Москва «3253» был адаптирован к репродукции в клетках Vero с использованием питательных сред Игла MEM и 199 (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 5 % сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия).

**Клетки.** Клеточная перевиваемая линия Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки) получена из коллекции ООО «Биолот» (Россия). Выращивание клеточной культуры осуществляли на среде Игла MEM (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 10% сыворотки КРС (ООО «Биолот», Россия).

**Антирабические сыворотки и иммуноглобулины.** В работе использовали антирабические сыворотки, полученные из крови гипериммунизированных лошадей и используемые в качестве исходного сырья для производства препарата антирабического иммуноглобулина. Также осуществляли исследование специфической активности образцов готового препарата «Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий, раствор для инъекций» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

**Реакцию нейтрализации вируса бешенства на белых мышах** осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ [12] с использованием штамма вируса бешенства CVS. Расчет результатов про-

водили с помощью метода Рида и Менча [12] с использованием программы для ЭВМ, разработанной для этой цели [3].

**Определение вируснейтрализующей активности** антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток с применением люминесцентного микроскопа («Микромед», Россия) и инфицирующей дозы вируса для клеточных культур (ИД<sub>50</sub>) осуществляли в соответствии с предыдущими исследованиями [2].

При определении вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина на культуре клеток с применением проточной цитометрии принимали во внимание рекомендации, разработанные Bordignon и Vengatesan [11, 13], а также результаты предыдущих собственных исследований [4].

Разведения вируса, а также исследуемых образцов сывороток и иммуноглобулина готовили на питательной среде Игла MEM или 199. К 0,5 мл исследуемого образца сыворотки или иммуноглобулина добавляли равный объем рабочего разведения вируса бешенства штамма «Москва 3253». Смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем смесь переносили в 6-луночные планшеты (Costar, США) для культивирования клеток и добавляли 0,5 мл суспензии клеток Vero в концентрации  $(3 \pm 1) \times 10^5$  кл/мл. Культуру клеток инкубировали в течение 72 ч, а затем осуществляли цитометрическое исследование. Аналогично готовили положительный и отрицательный контрольные образцы. Положительным контрольным образцом являлась клеточная суспензия, инфицированная вирусом бешенства без добавления антирабических сывороток или иммуноглобулина. Отрицательным контрольным образцом являлись интактные клетки.

Для проведения анализа клеточной суспензии на проточном цитометре CyAn ADP Cytometry (Дания) клетки прикрепляли от поверхности планшета с помощью раствора трипсина и версена [8] и суспендировали в растворе DPBS (ООО «Биолот», Россия). Затем с помощью набора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США) осуществляли фиксацию и пермеабиллизацию клеток [13]. Иммунофлуоресцентное окрашивание антигена в клеточной цитоплазме осуществляли диагностическим антирабическим иммуноглобулином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) (ВНИИЗЖ, г. Владимир). При работе использовали рабочее разведение диагностического препарата, рекомендованное производителем для проведения анализов с применением люминесцентной микроскопии. Образцы анализировали со скоростью около 500 клеток в секунду на проточном цитометре, снаряженным арговым лазером мощностью 20 МВт, при длине волны эмиссии 488 нм. Для ведения протокола анализа использовали программное обеспечение Summit 4.3 Built 2445. Настройки про-

граммы устанавливали таким образом, чтобы на цитограммах по параметрам интенсивности прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния неповрежденные живые клетки Vero отличались от клеточного дебриса и погибших клеток, имеющими характерные изменения клеточного размера и внутриклеточной структуры [7]. Область интенсивности флуоресценции, соответствующую инфицированным клеткам, идентифицировали в окне Dot Plot SS/FITC FL [13] путем повышения высоковольтного напряжения на фотодетекторе до величины  $(300 \pm 40)$  В. Значения интенсивности флуоресценции в данной области составили более 10 условных единиц. Долю инфицированных клеток определяли как процентное отношение числа клеток, зарегистрированных в этой области, к общему числу исследованных клеточных элементов.

Расчет вируснейтрализующей активности исследуемых образцов осуществляли по результатам цитометрического анализа разведений второго стандартного образца активности антирабического иммуноглобулина, имеющего активность 30 МЕ в 1 мл (NIBSC, Великобритания). Из указанного стандартного образца готовили двукратные разведения с активностью от 0,02 до 3,0 МЕ в 1 мл. К полученным разведениям добавляли клетки и вирус, а затем проводили цитометрический анализ, как описано в предыдущих разделах настоящей статьи. Полученные результаты использовали для построения калибровочного графика, определяющего зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания вируснейтрализующих антител. Индекс ингибирования инфекции для каждо-

го образца рассчитывали при сравнении с процентным содержанием инфицированных клеток в положительном контрольном образце:

$$I = \left(1 - \frac{N_i}{N_k}\right) \times 100\%,$$

где  $I$  — индекс ингибирования инфекции;  $N_i$  — количество инфицированных клеток в исследуемом образце;  $N_k$  — количество инфицированных клеток в положительном контрольном образце.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли по стандартным общепринятым методам [5].

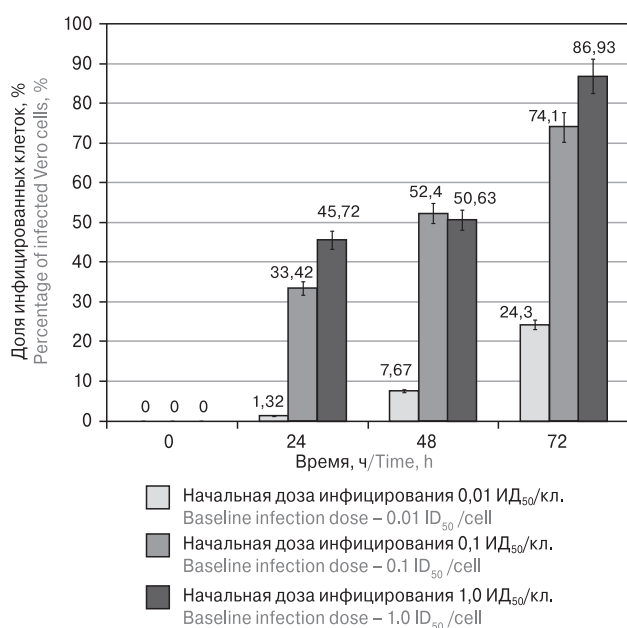
## Результаты

На первом этапе исследования подбирали оптимальную начальную инфицирующую дозу вируса бешенства. Вирусосодержащую жидкость добавляли к суспензии клеток Vero в дозе 0,01; 0,1 и 1 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку. Конечная концентрация клеток Vero в исследуемой суспензии составила от 0,8 до  $1,2 \times 10^5$  клеток в 1 мл.

Согласно результатам, представленным на рисунке 1, добавление вируса к клеткам в дозе 0,1 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку через 72 ч приводило к появлению  $(74,1 \pm 6,2)\%$  инфицированных клеток в общей популяции. Увеличение дозы заражения до 1 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку не приводило к заметному возрастанию доли инфицированных клеток, а добавление вируса концентрации 0,01 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку является недостаточным для использования при определении уровня антирабических антител. Таким образом, для последующих экспериментов, связанных с анализом содержания специфических антител, использовали дозу вируса 0,1 ИД<sub>50</sub> на 1 клетку.

На следующем этапе исследования определяли зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания вируснейтрализующих антител с использованием второго международного стандарта специфической активности человеческого иммуноглобулина. Цитометрический анализ клеточной суспензии проводили через 72 ч после добавления смеси вируса и антител к клеточной культуре. Примеры цитограмм показаны на рисунке 2.

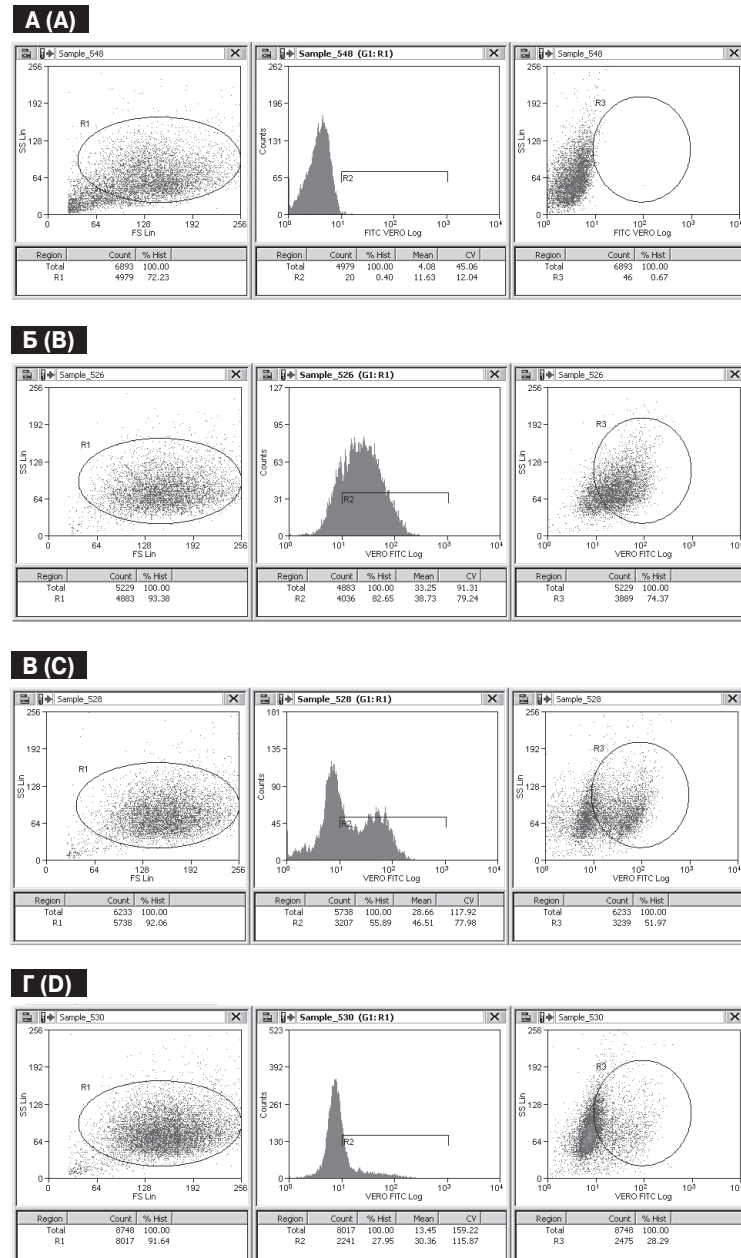
Результаты исследования ряда последовательных разведений стандартного образца представлены на рисунке 3. Полученную зависимость индекса ингибирования инфекции при репродукции вируса в клеточной культуре Vero от исходного содержания антител в образце использовали в качестве калибровочного графика при обработке результатов, полученных при исследовании образцов сыворотки и иммуноглобулинов с неизвестным содержанием антител. Для определения уровня антител с применением проточной цитометрии образцы антирабических сывороток и иммуноглобулина предва-



**Рисунок 1. Зависимость доли инфицированных клеток Vero от начальной дозы инфицирования**  
Figure 1. Baseline infection dose/percentage infected Vero cells ratio

рительно разводили в солевом растворе соответственно в 20 и 200 раз. Далее фактор разведения учитывали при расчетах конечного значения специфической активности исследуемого образца, которое выражали в МЕ/мл.

Результаты сравнительного исследования образцов антирабических сывороток и иммуноглобулина представлены в таблице. Полученные значения специфической активности сопоставляли с аналогичными показателями, получен-



**Рисунок 2.** Цитограммы клеточной культуры Vero

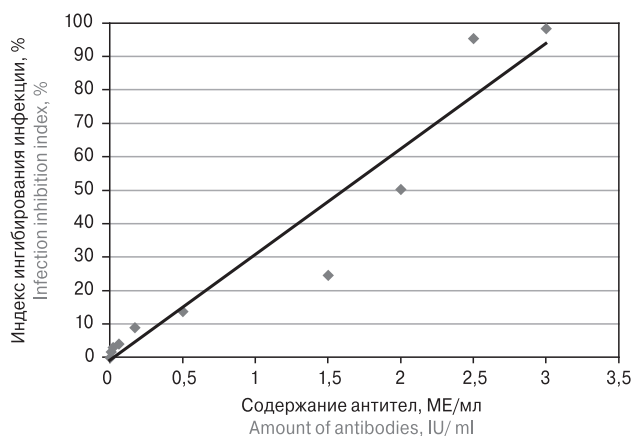
Figure 2. Vero cell cytograms

**Примечание.** Области, содержащие инфицированные клетки, обозначены на цитограмме маркерами R1, R2 и R3.

А) интактная клеточная культура без добавления антирабического иммуноглобулина и вируса бешенства (отрицательный контроль); Б) клеточная культура, инфицированная рабочим разведением вируса бешенства (положительный контроль); В) клеточная культура, инфицированная смесью, содержащей рабочее разведение вируса бешенства и антирабические антитела в концентрации 1,0 МЕ/мл; Г) клеточная культура, инфицированная смесью, содержащей рабочее разведение вируса бешенства и антирабические антитела в концентрации 2,0 МЕ/мл.

Note. Regions depicting infected Vero cells are denoted by R1, R2 and R3 markers.

А) intact cells added with no rabies immunoglobulin and rabies virus (negative control); Б) cells infected with rabies virus at optimal dilution (positive control); В) cells infected with rabies virus at optimal dilution added with 1.0 IU/ml rabies antibodies; Д) cells infected with rabies virus at optimal dilution added with 2.0 IU/ml rabies antibodies.



**Рисунок 3. Зависимость индекса ингибирования инфекции от содержания антирабических антител**

Figure 3. A relationship between an infection inhibition index and rabies antibody level

**Таблица. Сравнение специфической активности антирабических сывороток и антирабического иммуноглобулина при исследовании методами *in vivo* и *in vitro***

Table. Specific activity of antirabies serum vs. immunoglobulin preparation examined by using *in vivo* and *in vitro* methods

Образец Sample	Специфическая активность образцов, МЕ/мл Sample-specific activity, IU/ml		
	Проточная цитометрия Flow cytometry	Люминесцентная микроскопия Fluorescent microscopy	Реакция нейтрализации на белых мышах Neutralization of rabies virus in white mice
Антирабическая сыворотка, образец 1 Antirabies serum, sample 1	8	18	16
Антирабическая сыворотка, образец 2 Antirabies serum, sample 2	10	12	19
Антирабическая сыворотка, образец 3 Antirabies serum, sample 3	12	20	20
Антирабическая сыворотка, образец 4 Antirabies serum, sample 4	24	16	12
Антирабический иммуноглобулин, образец 5 Antirabies immunoglobulin, sample 5	420	323	223
Антирабический иммуноглобулин, образец 6 Antirabies immunoglobulin, sample 6	250	199	164
Антирабический иммуноглобулин, образец 7 Antirabies immunoglobulin, sample 7	380	343	242
Антирабический иммуноглобулин, образец 8 Antirabies immunoglobulin, sample 8	210	199	170
Антирабический иммуноглобулин, образец 9 Antirabies immunoglobulin, sample 9	260	222	170
Антирабический иммуноглобулин, образец 10 Antirabies immunoglobulin, sample 10	240	202	159
Антирабический иммуноглобулин, образец 11 Antirabies immunoglobulin, sample 11	320	269	212
Антирабический иммуноглобулин, образец 12 Antirabies immunoglobulin, sample 12	360	272	154

**Примечание.** Коэффициент корреляции при сравнении результатов, полученных методами с применением проточной цитометрии и реакции нейтрализации на белых мышах — 0,92; коэффициент корреляции при сравнении результатов, полученных методами с применением проточной цитометрии и люм-микроскопии — 0,98.

Note. A correlation coefficient calculated by comparing the data obtained by using flow cytometry vs. neutralization reaction in white mice or flow cytometry vs. fluorescent microscopy was 0.92 and 0.98, respectively.

ными с использованием реакции нейтрализации на белых мышах [12] и модифицированного метода иммунофлуоресценции [2].

## Обсуждение

Определение вируснейтрализующих антител является одной из распространенных задач в исследованиях, связанных с диагностикой иммунитета у людей и животных, а также контролем качества антирабических препаратов. Результаты анализа содержания защитных антител позволяют в конечном итоге сделать выводы об иммуногенности вакцин или о способности сывороточных препаратов обеспечивать пассивный иммунитет.

В настоящем исследовании предложен подход для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина, предназначенного для постэкспозиционной профилактики бешенства. Исследование со-

держания нейтрализующих антител основано на применении проточной цитометрии.

Положительные результаты применения цитометрического анализа для определения нейтрализующей способности сывороток к вирусу бешенства подробно описаны в зарубежной литературе [11, 13].

Особенностью предлагаемого метода является использование культуры клеток Vero и фиксированного штамма вируса бешенства «Москва 3253», адаптированного к репродукции в клетках этой линии. Ранее указанные культура клеток и штамм нашли успешное применение при разработке метода определения вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина с учетом результатов с помощью люминесцентной микроскопии [2]. Более того, для обнаружения инфицированных клеток предложено использование конъюгата антирабического иммуноглобулина с ФИТЦ, произведенного в России (ВНИИЗЖ, г. Владимир). Этот диагностикум был успешно применен в предыдущих исследованиях по обнаружению клеток, инфицированных вирусом бешенства, с использованием проточной цитометрии [4]. Тем не менее, данное обстоятельство не ограничивает использование аналогичных препаратов, предназначенных для этой цели.

На этапе пермеабиллизации клеточной мембраны, необходимом для дальнейшего обнаружения внутриклеточных антигенов вируса, использовали реагент Cytoperm/Cytofix (BD Pharmingen, США), зарекомендованный зарубежными исследователями [10, 13]. Формальдегид, входящий в состав этого реагента, полностью инактивирует вирус бешенства, что позволяет считать предлагаемый метод соответствующим принципам биологической безопасности.

Активность антирабических сывороток и иммуноглобулина определяли с помощью калибровочного графика, построенного на данных исследования ряда разведений стандартного образца иммуноглобулина с известным содержанием антител, сравнивая индекс ингибиции инфекции изучаемого образца со значениями данного показателя на графике.

Для анализа исследуемых образцов сывороток и иммуноглобулина использовали соответственно 20- и 200-кратные разведения. В этом случае ожидаемое содержание вируснейтрализующих антител в разведении исследуемого образца находилось в диапазоне от 0,75 до 1,5 МЕ в 1 мл.

Изменение содержания антител в разведении приводило к усложнению интерпретации результатов. Например, при смешивании равных объемов разведения иммуноглобулина, содержащего антитела более 2,5 МЕ в 1 мл и вирусосодержащей жидкости с активностью 0,1 ИД<sub>50</sub> в 1 мл наблюдали практически полную нейтрализацию образца вируса бешенства, что проявлялось в уменьшении количества инфицированных клеток до 1–2%. Значительное увеличение кратности разведения исследуемого образца сыворотки или иммуноглобулина, так же как и увеличение активности вирусосодержащей жидкости до значения более 1 ИД<sub>50</sub> в 1 мл, приводило к увеличению количества инфицированных клеток до 60–70%, что сопоставимо с результатами анализа положительного контрольного образца.

В отличие от аналогичных работ зарубежных исследователей [11, 13], в настоящем исследовании впервые приведено сравнение результатов, полученных с помощью проточной цитометрии, с результатами, полученными при определении активности антирабических препаратов в реакции нейтрализации на белых мышах. При сравнении результатов указанных тестов, установлен высокий коэффициент корреляции, равный 0,92, что позволяет рекомендовать предлагаемый метод для практического применения, особенно на этапе промежуточного контроля иммунных сывороток, предполагающего исследование большого количества образцов. При сравнении предлагаемого метода и разработанного ранее модифицированного метода иммунофлуоресценции [2], также установлен высокий коэффициент корреляции, равный 0,98.

На наш взгляд, для анализа большого количества образцов использование проточной цитометрии представляется наиболее перспективным благодаря возможности автоматического учета результата с достаточно высокой точностью.

## Список литературы/References

1. Вишняков И.Ф., Недосеков В.В., Груздев К.Н., Балышев В.М., Жестерев В.И., Горшкова Т.Ф. Способ определения антирабических вируснейтрализующих антител. Патент РФ 2130187. Оpubл. 10.05.1999. [Vishnjakov I.F., Nedosekov V.V., Gruzdev K.N., Balyshev V.M., Zhesterev V.I., Gorshkova T.F. Method of assay of antirabies virus-neutralizing antibodies. Patent RF 2130187. Publ. 10.05.1999. (In Russ.)]
2. Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Галкина М.В., Кочкин А.В. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции // Биотехнология. 2018. Т. 34, № 4. С. 83–88. [Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Abramova E.G., Savitskaya L.V., Galkina M.V., Kochkin A.V. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 2018, vol. 34, no. 4, pp. 83–88. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88 (In Russ.)]
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А., Никифоров А.К. Программа для расчета результатов реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах по методу Рида и Менча. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2016617051. 23 июня 2016 г. [Generalov S.V., Abramova E.G., Savitskaya L.V.,

- Lobovikova O.A., Nikiforov A.K. The program for calculating the results of the neutralization reaction of rabies virus on white mice according to the method of Reed and Muench. Certificate of state registration of the computer program. No. 2016617051. June 23, 2016 (In Russ.)
4. Кравцов А.Л., Генералов С.В., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Кочкин А.В., Никифоров А.К. Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2018. № 3. С. 18–25. [Kravtsov A.L., Generalov S.V., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Kochkin A.V., Nikiforov A.K. Determination of the rabies virus infected Vero line cell portion by flow cytometry. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 3, pp. 18–25. (In Russ.)]
  5. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometry. Moscow: High school, 1990. 352 p. (In Russ.)]
  6. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Суровяткин А.В., Петров А.А., Казанцев А.В., Бережной А.М., Зверев А.Ю., Маношкин А.В., Кротков В.Т., Кутаев Д.А., Максимов В.А., Кузнецов С.Л., Вахнов Е.Ю., Тимофеев М.А., Мовсесянц А.А., Борисевич С.В. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. № 3. С. 27–32. [Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berzhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timopheev M.A., Movsesyants A.A., Borisevich S.V. Epidemiological situation and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsiy = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2017, no. 3, pp. 27–32. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32 (In Russ.)]
  7. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск: Бумажный двор, 2008. 195 с. [Sibiryak S.V., Khaidukov S.V., Zurochka A.V. Evaluation of apoptosis in immunological studies. Issues of modern flow cytometry. Clinical application. *Chelyabinsk: Paper yard*, 2008. 195 p. (In Russ.)]
  8. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. 691 с. [Freshney R.Y. Culture of animal cells: a practical guide. Moscow: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2010. 691 p. (In Russ.)]
  9. Bedekovic T., Lemo N., Lojic I., Mihaljevic Z., Jungic A., Cvetnic Z., Sac Z., Hostnik P. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J. Virol. Methods*, 2013, vol. 189, no. 1, pp. 204–208. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.01.022
  10. Bordignon J., Ferreira S., Caporale G., Carreri M.L., Kotait I., Lima H.C. Zanetti C.R. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Methods*, 2002, vol. 105, no. 1, pp. 181–186. doi: 10.1016/S0166-0934(02)00064-2
  11. Bordignon J., Comin F., Ferreira S., Caporale G., Lima Filho J.H., Zanetti C.R. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2002, vol. 44, no. 3, pp. 151–154.
  12. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4<sup>th</sup> ed. Geneva, Switzerland: WHO, 1996, 476 p.
  13. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A., Ramadass P., Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006, vol. 70B, no. 5, pp. 335–343. doi: 10.1002/cyto.b.20104
  14. WHO Expert Consultation on Rabies: second report. WHO technical report series 982. Geneva, Switzerland, 2013, 139 p.

**Авторы:**

**Генералов С.В.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Кравцов А.Л.**, д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Кожевников В.А.**, младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Гаврилова Ю.К.**, научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Абрамова Е.Г.**, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории профилактических иммуноглобулинов отдела профилактических препаратов ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия;

**Никифоров А.К.**, д.б.н., зам. директора по экспериментальной и производственной работе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия.

**Authors:**

**Generalov S.V.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

**Kravtsov A.L.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

**Kozhevnikov V.A.**, Junior Researcher, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

**Gavrilova Yu.K.**, Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

**Abramova E.G.**, PhD, MD (Biology), Head Researcher, Laboratory of Prophylactic Immunoglobulins of the Department of Preventive Drugs, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;

**Nikiforov A.K.**, PhD, MD (Biology), Deputy Director of the experimental and production work, Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.11.2018  
Отправлена на доработку 11.03.2019  
Принята к печати 13.03.2019

Received 09.11.2018  
Revision received 11.03.2019  
Accepted 13.03.2019