

6. *Mimura J., Fujii-Kuriyama Y.* // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2003. — Feb. — Vol. 1619, № 3. — P. 263—268.

7. *Nijkamp F. P., Parnham M. J.* *Principles of Immunopharmacology.* — Springer, 2011. — 760 p.

8. *Singh K. P., Casado F. L., Opanashuk L. A., et al.* // *Biochemical Pharmacology.* — 2009. — Vol. 77, № 4. — P. 577—587.

## Контактная информация

**Горшенин Андрей Вадимович** — к. м. н., заведующий лабораторией иммунологии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, e-mail: gorshenin@nihtop.r

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

**Т. В. Замарина, Н. П. Храпова, И. И. Корсакова, Е. В. Пименова**

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,  
Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра молекулярной биологии и генетики*

Представлена развернутая характеристика панели моноклональных антител против различных эпитопов гликопротеина капсулы 200kDa возбудителя мелиоидоза, описаны критерии подбора компонентов экспериментальной тест-системы иммуноферментной и определены ее диагностические возможности.

*Ключевые слова:* мелиоидоз, диагностика, моноклональные антитела, твердофазный иммуноферментный метод.

## DESIGNING AN EXPERIMENTAL ELISA KIT BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST 200 KDA ANTIGEN OF THE MELIOIDOSIS AGENT

**T. V. Zamarina, N. P. Khrapova, I. I. Korsakova, E. V. Pimenova**

A detailed description of monoclonal antibodies against glycoprotein 200 kDaB pseudomallei was provided. The criteria for selecting the components of the experimental ELISA kit were described and its diagnostic potential was estimated.

*Key words:* melioidosis, monoclonal antibodies, identification of pathogenic burkholderia, ELISA.

Мелиоидоз — опасное и потенциально смертельное заболевание людей, распространенное в эндемичных регионах юго-восточной Азии и Северной территории Австралии. Этиологический агент мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, широко распространен в почве и воде эндемичных зон [10]. Летальность при несвоевременно начатой терапии у больных мелиоидозом может достигать 90 %, а при лечении самыми современными препаратами в условиях стационара составляет от 19 % (Австралия) и до 51 % (Таиланд) [9].

Согласно принятой в нашей стране классификации, возбудитель мелиоидоза является микроорганизмом II группы патогенности для человека. С 2005 г. мелиоидоз внесен в перечень инфекций, требующих постоянного надзора в связи с расширением зон эндемичного распространения этого патогена, отсутствием зарегистрированных средств специфической профилактики, а также эффективных схем лечения данного заболевания.

Для экспресс- и ускоренного обнаружения возбудителя мелиоидоза применяют ряд иммунодиагностических тестов: метод флуоресцирующих антител (МФА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФМ), а также реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) [2].

В последние годы возрос интерес к созданию иммунодиагностических препаратов на основе моноклональных антител (МКА) к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*. Установлено, что выявление вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза, их дифференциация от авирулентных штаммов, обусловлено присутствием в капсуле бактерий гликопротеина с м. м. 200 kDa [5].

В связи с этим, одним из актуальных направлений в совершенствовании лабораторной диагностики мелиоидоза является разработка средств дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов *B. pseudomallei*, выделяемых из проб клинического материала и объектов внешней среды [4].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei* и оценка ее диагностических возможностей.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали различные антигены (АГ) буркхольдерий II и III групп патогенности и гетерологичных микроорганизмов. Все этапы работы с живыми куль-

турами бактерий были проведены в соответствии с СП 1.3.1285-03.

Водно-солевые экстракты (ВСЭ) получали из обеззараженных и высушенных ацетоном клеток *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Гликопротеин капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa был получен с помощью модифицированного метода Фуллера [3].

Основу тест-системы составляли МКА к гликопротеину 200 kDa различной эпитопной направленности, вырабатываемые гибридомами-продуцентами из коллекции лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. С целью последующего культивирования клеток и накопления МКА в препаративных количествах *in vitro* гибридомы были выведены из состояния глубокого холода (-196 °C). Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> и 70—80 % влажности с использованием среды RPMI-1640 с добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина, пирувата натрия. Отбор клонов, секретирующих МКА в среду выращивания, проводили после регистрации положительных результатов непрямого варианта ТИФМ, применявшегося в качестве метода скрининга антителопродукции гибридом. Контрольным АГ служил гликопротеин 200 kDa *B. pseudomallei* 100.

Накопление МКА *in vivo* осуществляли внутрибрюшинным введением 1—5·10<sup>6</sup> клеток гибридом линейным мышам BALB/c, предварительно праймированным пристаном за 5—7 дней до введения клеток. МКА получали из асцитической жидкости (АЖ) мышей.

Иммуноглобулины выделяли из АЖ методом трехкратного переосаждения белка сульфатом аммония. В непрямом методе флюоресцирующих антител оценивали специфическую активность МКА, а в реакции иммунодиффузии подтверждали их гомогенность и видовую принадлежность.

Иммунпероксидазные конъюгаты (ИПК) получали по методу Nakane P. K., Kawaoi A. [8]. Рабочее разведение каждого из них определяли, используя методику шахматного титрования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная тест-система представляла собой сэндвич-вариант ТИФМ. Первый ее компонент — индивидуальные образцы МКА или их смеси, используемые в качестве лигандов, сорбируемых на твердой фазе, второй — антиген 200 kDa *B. pseudomallei* 100, третий — ИПК.

Оптимальный состав смеси первого порядка определяли, основываясь на данных о конкурентном взаимоотношении антител и величинах констант аффинности МКА с контрольным образцом АГ.

Данные о конкурентных взаимоотношениях МКА были получены с помощью методики определения

индексов аддитивности различных пар МКА, предложенной Friguet B. с соавторами [7]. Подробные сведения о выполнении этого раздела были опубликованы ранее [1]. Аффинность МКА в отношении контрольного АГ определяли по методике, предложенной Beatty J. D. [6].

В результате выполнения этой серии экспериментов было установлено, что наибольшая чувствительность иммуноферментной реакции достигалась при использовании смеси МКА 3C<sub>6</sub> + 5C<sub>2</sub> + 2A<sub>6</sub> с концентрацией белка от 10 до 20 мкг/мл. При повышении нагрузки до 50 мкг/мл чувствительность реакции существенно снижалась.

При подборе детектирующих антител, на основе которых были приготовлены ИПК, были апробированы четыре варианта моноклональных иммуноглобулинов к антигену 200 kDa. Наибольшая чувствительность тест-системы обеспечивалась при использовании ИПК на основе МКА 5C<sub>2</sub>.

Таким образом, после завершения этапов оптимизации условий подготовки твердой фазы, выбора МКА для получения ИПК, была сконструирована экспериментальная тест-система и созданы условия для проверки ее чувствительности при работе с различными образцами АГ.

Чувствительность тест-системы в реакции со стандартным АГ составляла 0,34 мкг/мл. Все этапы постановки реакции выполняли согласно общепринятым рекомендациям.

Экспериментальную тест-систему использовали для контроля качества различных серий антигена 200 kDa, приготовленных по стандартной методике, но из различных партий сырья. Результаты реакции выявили существенные колебания в содержании АГ в ряде серий препарата гликопротеина — от 0,98 до 46 мкг/мл. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что при изготовлении контрольных образцов гликопротеина 200 kDa необходимо применять не только методы анализа химического состава, но и определять уровень иммунологически активного АГ.

Вторая серия опытов была посвящена определению концентрации антигена 200 kDa в смесях водорастворимых АГ, экстрагированных из обеззараженных ацетоном микробных клеток (ВСЭ) различных штаммов патогенных видов буркхольдерий (*B. pseudomallei* и *B. mallei*), а также гетерологических видов микроорганизмов. Всего было проверено 29 образцов ВСЭ, изолированных из 17 штаммов *B. pseudomallei*, 3 штаммов *B. mallei*, 9 штаммов гетерологических видов буркхольдерий. В 11 образцах ВСЭ *B. pseudomallei* из 17 проверенных (71 %) был выявлен антиген 200 kDa. Минимальная детектируемая концентрация АГ при этом составляла 2,17 мкг/мл (*B. pseudomallei* 56812). При постановке реакции с тремя образцами ВСЭ *B. mallei* в одном случае реакция была положительной.

При постановке ТИФМ с ВСЭ штаммов гетерологических микроорганизмов (*B. thailandensis*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) чувствительность обнаружения была значительно ниже.

При работе со взвесью живой культуры слабовирулентного штамма *B. pseudomallei* 107 чувствительность экспериментальной тест-системы составляла  $5 \cdot 10^6$  м.к./мл. При постановке реакции со взвесью близкородственных буркхольдерий *B. thailandensis* 264 был получен отрицательный результат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технология изготовления экспериментальной тест-системы, пригодной для обнаружения гликопротеина капсулы с м.м. 200 kDa в водорастворимых антигенных смесях и взвешях живых культур патогенных буркхольдерий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Булатова Т. В. Применение моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза для конструирования экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной / Т. В. Булатова // Применение моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза для конструирования экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной: Матер. науч.-практ. конф., 26—28 сент. 2013 г. — Новосибирск, 2013. — С. 120—123.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией акад. РАМН Г. Г. Онищенко, акад. РАМН В. В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. — М.: ЗАО «Шико», 2013. — 560 с.
3. Пивень Н. Н. Выделение, очистка и химический состав поверхностного полисахаридного антигенного комплекса возбудителя мелиоидоза / Н. Н. Пивень, В. И. Смирнова // Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Вып. 4 / Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, 1990. — С. 111—117.
4. Храпова Н. П., Алексеев В. В., Корсакова И. И. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — В. 107. — С. 66—69.
5. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., et al. // Acta Tropica. — 2000. — Vol. 74. — P. 221—228.
6. Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G. // J Immunol Methods. — 1987. — Vol. 100. — P. 173—179.
7. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Pages J., et al. // J. Immunol. Methods 60: 351—358.
8. Nakane P. K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. — 1974. — Vol. 22, № 12. — P. 1084—1091.
9. Thepthai C., Smithtikarn S., Sukswan M., et al. // Asian Pac J Allergy Immunol. — 2005. — Vol. 23 (2—3). — P. 127—132.
10. Wiersinga W. J., Van der Poll T., White N. J., et al. (2006) // Nat Rev Microbiol. — 2006. — P. 272—282.

## Контактная информация

**Замарина Татьяна Валерьевна** — научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

УДК 616.33-002.153-097-053.2

## ГЕННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФАКТОРА ТОРМОЖЕНИЯ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ И *HELICOBACTER PYLORI*

**Э. В. Дудникова, М. С. Чернова, А. С. Бадьян, А. С. Водопьянов, Р. В. Писанов, С. А. Заруцкий, Э. В. Зазьян, Н. У. Азиева**

*Противочумный институт, Ростов-на-Дону,  
Ростовский государственный медицинский университет*

В статье представлены данные о роли фактора торможения миграции макрофагов в прогнозировании течения и исхода заболеваний верхнего отдела желудочно-кишечного тракта у детей.

**Ключевые слова:** фактор торможения миграции макрофагов, прогнозирование, характер течения, исход, заболевания верхнего отдела желудочно-кишечного тракта.

## GENE POLYMORPHISM MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR AND *HELICOBACTER PYLORI*

**E. V. Dudnikova, M. S. Chernova, A. S. Badyan, A. S. Vodopynov, R. V. Pisanov, S. A. Zarutskiy, E. V. Zazyan, N. U. Azieva**

The article presents the findings of agent's role macrophage migration inhibitory factor in prediction of the course and outcome alimentary tract upper part diseases in children.

**Key words:** macrophage migration inhibitory factor, prediction, the course character, outcome, alimentary tract upper part diseases.

В настоящее время инфекция *Helicobacter Pylori* (HP) приобретает черты «пандемии» и выявляется более чем у 50 % населения планеты, в связи с чем представляется крайне важным изучение ее эпидемиологических аспектов. В развивающихся странах большинство пациентов заражается уже в детском возрасте, и к 20 го-