этиологию заболевания, подобрать лечение и проводить эпидемиологический мониторинг.

Литература

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03

2. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности: Методические указания. МУ 1.3.2569-09

3. Janse I., Hamidjaja R.A., Hendriks AC, van Rotterdam BJ. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // BMC Infect Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 86.

Ответственный автор:
Лемасова Людмила Викторовна – научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

---

УДК: 579.61:616.982.27-078

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 KDA *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Е.Э. Ким[1] , Н.П. Храпова[1,2], Т.В. Замарина[1]
[1]ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград;
[2]ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Представлена детальная характеристика флуоресцирующих иммуноглобулинов на основе моноклональных антител к антигену200 kDa капсулы возбудителя мелиоидоза. Статья содержит данные об их применении для исследования материала, полученного от биопробных животных.

Ключевые слова: *мелиоидоз, антиген 200 kDa, моноклональные антитела, метод флуоресцирующих антител.*

DIAGNOSTIC CAPABILITIES OF EXPERIMENTAL FLUORESCENT IMMUNOGLOBULINS BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES TO BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ANTIGEN 200KDA

E.E. Kim[1], N.P. Khrapova[1,2], T.V. Zamarina[1]
Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd[1]; Volgograd State Medical University, Volgograd[2]

Detailed characteristic of experimental fluorescent immunoglobulins based on monoclonal antibodies

against200 kDa antigen of Burkholderia pseudomallei was presented. This article contains information about its applicability for samples from experimental animal models.
Key words: *melioidosis, antigen 200 kDa, monoclonal antibodies, method of fluorescent antibodies.*

Возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – микроорганизм II группы патогенности. В общей схеме лабораторного анализа проб клинического материала и объектов внешней среды иммунодиагностическому тестированию отводится важная роль, особенно в первые часы от момента их поступления на исследование. Одним из наиболее востребованных регламентированных иммунодиагностических экспресс-методов обнаружения микроорганизмов в различных объектах является метод флуоресцирующих антител (МФА) [1].

В рамках совершенствования средств индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза получило развитие направление исследований по созданию высокоэффективных диагностических препаратов, в том числе и для МФА, базирующееся на экспериментальных доказательствах того, что гликопротеин капсулы с м.м. 200 kDa является характерным признаком вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза [2].

Цель работы – изучение диагностических свойств панели моноклональных иммуноглобулинов к антигену *B. pseudomallei* с м.м. 200kDa, меченных флуорохромом, в МФА при работе с чистыми культурами микроорганизмов и с мазками-отпечатками органов биопробных животных, зараженных коллекционными штаммами буркхольдерий II и III-IV групп патогенности.

Материалы и методы

Источником получения моноклональных антител (МКА) к эпитопам поверхностных антигенов микробных клеток *B. pseudomallei* являлись гибридомы-продуценты из коллекции лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Метку иммуноглобулинов, очистку конъюгата ФИТЦ-белок выполняли по методике [3]. Готовые конъюгаты характеризовали по параметрам качества, затем ампулировали и хранили при минус 20 ˚С.

В работе использовали штаммы буркхольдерий II (*B. pseudomallei* – 49 штаммов, *B. mallei* – 10 штаммов) и III-IV (*B. thailandensis* –пять штаммов, *B. cepacia* – пять штаммов, *B. gladioli* – три штамма) групп патогенности, полученные из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Буркхольдерии выращивали на агаре, приготовленном на основе гидролизата казеина, с 5 % глицерина, pH 6,8, при 37 ˚С в течение 48 ч. Работу с бактериями выполняли в соответствии с положениями СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2518-09 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» Дополнения и изменения № 1 к СП 1.3.2322-08».

Результаты и обсуждение

После очистки конъюгатов и расчета основных показателей результативности конъюгирования для последующей работы был отобран ряд экспериментальных серий, охарактеризованных по показателям концентрации белка в препарате, молярного соотношения ФИТЦ/белок и величине рабочего разведения.

Полученные данные показали, что из 10 типов МКА лишь четыре по своим параметрам перспективны для дальнейшего изучения.

Следующим этапом работы явилась оценка спектра специфической активности для выбранной группы экспериментальных препаратов. Для этого использовали широкий набор музейных штаммов возбудителей мелиоидоза. В качестве контроля был взят производимый в настоящее время стандартный препарат на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза ($1F_4$).

В ходе экспериментов установлено, что препараты на основе МКА $3C_6$, $5C_2$, $5H_{11}$, $6A_{11}$ обладали наиболее широким спектром специфической активности. Они взаимодействовали с антигеном 200 kDa, локализованным на поверхности микробных клеток.

Специфичность всех экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных оценивали по результатам окрашивания мазков-препаратов, приготовленных из взвесей гетерологичных микроорганизмов II и III-IV групп патогенности: *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *B. allicola, B. gladioli*, *B. marginata, P. putida*.

Контрольный препарат обнаруживал все штаммы *B. pseudomallei.* Специфичность экспериментальных образцов была различной. Три из четырех вновь приготовленных препаратов ($3C_6$, $5H_{11}$ и $6A_{11}$) проявили себя как специфичные диагностические средства, не взаимодействующие ни с одним

из взятых в работу штаммов гетерологичных микроорганизмов. Только конъюгат $5C_2$ обладал перекрестной активностью в отношении одного штамма *B. thailandensis* и одного штамма *B. cepacia*. Наибольший интерес представляют данные об отсутствии кросс-реактивности МКА $3C_6$, $5H_{11}$, $6A_{11}$ в отношении *B. thailandensis* – буркхольдерии, наиболее близкой в антигеном отношении к *B. pseudomallei*. Этот факт заслуживает внимания, так как по данным литературы, подавляющее большинство экспериментальных препаратов и тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя мелиоидоза, не позволяют дифференцировать эти два вида буркхольдерий.

Анализ представленных данных позволяет сделать вывод о том, что конъюгаты, приготовленные на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, обладают высокими показателями специфичности.

При воспроизведении регламентированной схемы индикации возбудителей особо опасных инфекций одним из обязательных этапов работы является исследование биопробного материала, в частности, мазков-отпечатков селезенки **[**1, 4**]**.

В опытах использовали штаммы *B. pseudomallei* 101 и *B. pseudomallei* 102. Животных заражали с учётом LD_{50} внутрибрюшинным способом введения бактерий и вскрывали на 3 и 21 сутки после заражения. Данные представлены в таблице.

При использовании всех вариантов конъюгатов возбудитель мелиоидоза не был обнаружен в отпечатках селезенки животных, зараженных *B. pseudomallei* 101 спустя трое суток. Через указанный промежуток времени три конъюгата из пяти выявляли микробные клетки *B. pseudomallei* 102 в пробах биологического материала. К 21 суткам количество антигена 200 kDa возрастало, и все варианты конъюгатов МКА-ФИТЦ давали положительный результат при просмотре мазков.

Таблица 1.

Результаты обнаружения возбудителя мелиоидоза в мазках-отпечатках селезенки биопробных животных с помощью МФА

Объект исследования	Инфицирующий агент	Срок после заражения (сут)	Конъюгаты МКА-ФИТЦ				
			$3C_6$	$5C_2$	$5H_{11}$	$6A_{11}$	$1F_4$
Мазки-отпечатки селезенки золотистых хомячков	*B. pseudomallei* 101	3	-	-	-	-	-
		21	+	+	+	+	+
	B. pseudomallei 102	3	-	-	+	+	+
		21	+	+	+	+	+

Примечание:
1. « - » – отрицательный результат МФА;
2. «+» – положительный результат реакции, соответствующий 3+ и 4+.

Таким образом, на основе МКА различной эпитопной направленности были получены экспериментальные образцы диагностических препаратов для МФА, охарактеризованные по параметрам качества, пригодные для работы как с чистыми культурами буркхольдерий, так и с пробами биологического материала*.*

Литература

1. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство / Под ред. Г. Г. Онищенко. – М., 2006. – 288 с.

2. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirsinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara − and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* // ActaTropica. – 2000. – V. 74. – P. 221-228.

3. Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., Прохватилова Е.В. Применение МКА в лабораторной диагностике природноочаговых и труднодиагностируемых инфекций // Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье: Сб. науч. тр. / под ред. Н.Г. Тихонова. – Волгоград, 2000. – С. 318-327.

4. Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Корсакова И.И. и др. Получение моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* и перспективы их применения для совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза// Матер. IX Межгос. науч.-практ. конф. – Волгоград, 2008.

– С.147-148.

Ответственный автор
Ким Екатерина Эдуардовна – младший научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Тел. (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.61:616.982.27-078

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНА 200 KDA *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В РЕАКЦИИ ИММУНОДИФФУЗИИ В ГЕЛЕ

Т.В. Замарина[1], Н.П. Храпова[1,2], И.И. Корсакова[1,2]
[1]ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград;
[2]ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Описаны условия постановки реакции иммунодиффузии в геле с моноклональными антителами (МКА), спБогоецифичными к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза. Определены варианты моноклональных антител с высокой специфической активностью в данной реакции.
Ключевые слова: *мелиоидоз, диагностика, моноклональные антитела, реакция иммунодиффузии в геле.*

APPLICATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION OF BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ANTIGEN 200 KDA BY DOUBLE IMMUNODIFFUSION TEST

T.V. Zamarina[1], N.P. Khrapova[1,2], I.I. Korsakova[1,2]
[1]Volgograd Plague Control Research Institute, [2]Volgograd; Volgograd State Medical University, Volgograd

The conditions for performing a double immunodiffusion test using monoclonal antibodies (MAb) against antigen 200 kDa of Burkholderia pseudomallei were described. The variants of high specific MAbs were identified.
Keywords*: melioidosis, diagnostics, monoclonal antibodies, double immunodiffusion test.*

Реакция иммунодиффузии (РИД) в геле не входит в схему лабораторной диагностики мелиоидоза и чаще всего ее применяют для аналитического изучения различных антигенных препаратов *Burkholderia pseudomallei* [2]. Несмотря на то, что моноклональные антитела (МКА) в качестве ингредиентов для постановки РИД на этапах идентификации различных микроорганизмов успешно применяли уже вскоре после внедрения гибридомной технологии [4], на отечественном и международном рынке коммерческие высокоактивные ингредиенты для постановки данной реакции отсутствуют.

Цель работы – изучение эффективности использования МКА для обнаружения гликопротеина 200 kDa возбудителя мелиоидоза – маркера вирулентных штаммов *B. pseudomallei* [3] при постановке РИД с водно-солевыми экстрактами (ВСЭ), антигенов возбудителей сапа, мелиоидоза и гете-