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. Замарина¹, Н.П. Храпова^{1,2}, И.И. Корсакова^{1,2}

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград;

²ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Описаны условия постановки реакции иммунодиффузии в геле с моноклональными антителами (МКА), специфичными 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. Zamarina¹, N.P. Khrapova^{1,2}, I.I. Korsakova^{1,2}

¹Volgograd Plague Control Research Institute, ²Volgograd; 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 гибридной 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-

рологических микроорганизмов.

Материалы и методы

В работе использовали антигены буркхольдерий II и III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*) и гетерологичных микроорганизмов (*Pseudomonas allicola*, *P. marginata*). Работу с живыми культурами бактерий проводили в соответствии с СП 1.3.1285-03.

Водно-солевые экстракты получали из обеззараженных и высушенных ацетоном микробных клеток. Гликопротеин капсулы *B. pseudomallei* 100 с м.м. 200 kDa, который являлся контрольным антигеном, был получен с помощью модифицированного метода Фуллера [1].

В качестве ингредиентов для постановки РИД использовали панель из 10 вариантов МКА к гликопротеину 200 kDa различной эпитопной направленности, вырабатываемые гибридомами-продуцентами из коллекции лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Гибридомы были выведены из состояния глубокого холода, культивированы при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ и 70-80 % влажности с использованием среды RPMI-1640 с добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина, пирувата натрия; МКА накоплены в препаративных количествах *in vitro*. Отбор позитивных клонов, секретирующих МКА в среду выращивания, осуществляли с помощью непрямого варианта ТИФМ.

Накопление МКА *in vivo* осуществляли внутрибрюшинным введением 5·10⁶ клеток гибридом линейным мышам BALB/c, иммуноглобулины выделяли из асцитической жидкости мышей методом трёхкратного переосаждения белка сульфатом аммония. Специфическая активность МКА была оценена с помощью непрямого метода флюоресцирующих антител.

Для выполнения реакции двойной иммунодиффузии в геле использовали агар Difco (1,5 г), который расплавливали в 100 мл забуференного 0,9 % раствора NaCl, pH 7,2 и разливали порциями в чашки Петри. Через сутки после застывания слоя агара в нем с помощью стандартного перфоратора делали лунки для внесения МКА и исследуемых антигенных препаратов. Объем ингредиентов в каждой лунке не превышал 30-35 мкл. МКА были взяты в концентрации от 12 до 15 мг/мл, а водно-солевые экстракты (ВСЭ) микробных штаммов – от 10 до 12 мг/мл. После внесения ингредиентов чашки помещали во влажную камеру и оценивали результат через 24-48 ч по наличию или отсутствию между лунками с образцами компонентов реакции линий преципитата. Положительный результат РИД свидетельствовал об образовании иммунных комплексов (антиген+гомологичные МКА).

Эффективность использования МКА для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза была изучена при постановке реакции преципитации с антигенами возбудителей сапа и мелиоидоза, а также гетерологичных микроорганизмов. С помощью РИД с ВСЭ возбудителя мелиоидоза было установлено, что 7 из 10 типов из панели МКА к антигену 200 kDa в разной степени обладали преципитирующей активностью.

Результаты и обсуждение

Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Сводные данные эффективности обнаружения антигена 200 kDa в ВСЭ штаммов возбудителя мелиоидоза (n=17)

Показатели обнаружения антигена 200 kDa	Наименование МКА						
	C ₆	A ₁₀	C ₂	A ₁₁	E ₇	F ₉	A ₈
Относительные значения (%)	1	2	6	1	2		6

Полученные данные позволили сделать вывод о том, что МКА 3C₆, 4A₁₀, 6A₁₁, 6E₇ дают возможность обнаружить антиген 200 kDa в РИД у 72-81 % типичных штаммов *B. pseudomallei*, в то время как моноклональные иммуноглобулины 5C₂ и 7A₈ выявляли антиген у 36 % штаммов. Интересно отметить, что все семь вариантов МКА преципитировали только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов. Специфичность и воспроизводимость РИД с исследуемой панелью МКА практически приближалась к 100 %.

Полученные сведения о способности МКА образовывать преципитаты значимы для решения вопроса об их применении в иммунохимическом анализе (Dot-иммуноанализ, иммуноблоттинг). Кроме

того, РИД с использованием описанных МКА может быть применена в качестве дополнительного метода для выявления антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в различных антигенных смесях.

Литература

1. Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М. и др. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхольдерий // Проблемы особо опасных инф.– 2012.– Вып. 113.– С. 82-85.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
3. 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* // Acta Tropica. – 2000. – V. 74. – P. 221-228.
4. Use of monoclonal antibody to increase sensitivity and specificity in quantitative immunodiffusion assay/ Glodel M., Montgomery R. R., Smith C.G. et al. // J. Immunol. Meth. – 1982. – Vol.48, N1. – P. 13-22.

Ответственный автор:

Замарина Татьяна Валерьевна – научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Тел. (395-2) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.61:616.982.27-07

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА В РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

А.М. Куделина¹, И.В. Новицкая², Е.В. Прохвятилова¹

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград,

²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Проведены исследования по разработке нового латексного препарата, способного идентифицировать *Burkholderia pseudomallei*. Подобрана концентрация блокирующего буфера. Оптимальная нагрузка мелиоидозных иммуноглобулинов на полистирольных частицах составила 4 мг/мл. Определены аналитические характеристики полученного диагностикума. **Ключевые слова:** реакция латекс-агглютинации, мелиоидоз, латексный диагностикум, сенситин, иммобилизация.

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTICUM FOR THE DETECTION OF MELIOIDOSIS AGENTS IN LATEX AGGLUTINATION REACTION

A. M. Kudelina¹, I.V. Novitskaya², E.V. Prokhvatilova¹

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd¹, Volgograd State Medical University, Volgograd²

Studies on the development of recent latex diagnosticum capable to identify *Burkholderia pseudomallei* were conducted. The concentration of blocking buffer was chosen. Optimal capacity of melioidosis immunoglobulins on polystyrene particles was 4 mg/ml. Analytical descriptions of the resulted diagnosticum were determined.

Key words: reaction of latex-agglutination, melioidosis, latex diagnosticum, sensitine, immobiliza-