

**ЕВДОКИМОВА Вероника Вячеславовна**

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ  
ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ  
O1, O139 СЕРОГРУПП ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ**

03.02.03 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону – 2018

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

**Научный руководитель:** **Алексеева Людмила Павловна**, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:** **Храпова Наталья Петровна**, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая отделом диагностики инфекционных болезней и лабораторией иммунодиагностики

**Осина Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией молекулярной диагностики

**Ведущая организация:** Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится **«20» сентября 2018 г.** в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Микшис Наталья Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** За последние годы оценка динамики заболеваемости холерой более чем в 170 странах мира свидетельствует о продолжающемся пандемическом распространении холерной инфекции по континентам и странам (Москвитина Э.А. с соавт., 2014, 2017; Титова С.В. с соавт., 2015, 2016), что определяет необходимость постоянного мониторинга и требует совершенствования методов экспресс-диагностики возбудителя холеры.

В иммунодиагностике особо опасных инфекций, в том числе холеры, современным направлением является использование тест-систем с визуальным учетом результатов, таких как иммунохроматография, твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, иммуносенсорные устройства. Проблема специфичности иммунологических тест-систем успешно решается при использовании иммуноглобулинов моноклонального типа, которые характеризуются высокой степенью гомогенности как по изотипам антител, так и эпитопной направленности, аффинитету, специфичности (Егоров А.М., 1991).

Из анализа современной литературы следует, что к числу высокочувствительных иммунодиагностических тестов детекции холерного вибриона и его факторов патогенности относится твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) и его дот-вариант (дот-ИФА) на нитроцеллюлозной мембране. Использование в этом случае моноклональных антител для обнаружения *V. cholerae* O1 и O139 обеспечивает высокую специфичность иммуноферментных методов.

**Степень разработанности темы исследования.** Зарубежными исследователями проводились, начиная с 80-х годов XX столетия, работы по получению МКА к поверхностным антигенам *V. cholerae* O1 и O139 (липополисахарид, белки внешних мембран, пили адгезии), а также холерному токсину, с последующим конструированием на их основе иммунологических тест-систем (ИФА-, дот-ИФА - наборы, иммунохроматографические «дипстики», иммуносенсоры) (Gustafsson B., 1984; Supawat K. *et al.*, 1994; Nato F. *et al.*, 2003; Jyoung J.Y. *et al.*, 2006; Tuteja U. *et al.*, 2007; Pongsuk C. *et al.*, 2011, 2013). На сегодняшний день, иностранными производителями иммунобиологических препаратов выпускается достаточное количество тест-систем на основе МКА, для экспресс-диагностики холерных вибрионов, в основном это иммунохроматографические «дипстики» с различной чувствительностью и биочипы.

В нашей стране работы по получению гибридом-продуцентов МКА к антигенам возбудителя холеры начались в конце 80-х годов XX столетия. Так, в Ростовском противочумном институте получали МКА к О-антигену *V. cholerae* O1, на основе которых были сконструированы коаггулинирующий диагностикум, агглютинирующие и флуоресцирующие антитела (Алексеева Л.П., Бурлакова О.С., 1988, 1993, 1998). Позднее, коллективу авторов (Л.П. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Маркина О.В., Чемисова О.С., 2000, 2002) удалось получить и охарактеризовать МКА к ЛПС *V. cholerae* O139. В последние 10 лет на основе МКА-O1 и МКА-O139 были наработаны экспериментальные серии диагностических препаратов, предназначенные для постановки реакции слайд-агглютинации, прямой иммунофлуоресценции (Алексеева

Л.П., Кретенчук О.Ф., 2014), проведены межлабораторные испытания и процедура государственной регистрации.

В институте «Микроб» разработаны иммуноферментные тест-системы для обнаружения холерного токсина, который является основным фактором патогенности холерных вибрионов (Девдариани З.Л. с соавт., 1997, 1999; Михеева Е.А. с соавт., 2012, 2017).

На сегодняшний день в Росздравнадзоре зарегистрировано 5 тест-систем на основе МКА для экспресс-диагностики холеры, позволяющие выявлять *V. cholerae* O1, O139 в реакции слайд-агглютинации, прямой иммунофлуоресценции, иммунохроматографическим методом, а также определять продукцию холерного токсина в иммуноферментном анализе. Однако отсутствуют зарегистрированные коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления специфических O1- и O139-антигенов холерных вибрионов. В связи с высокой чувствительностью метода и возможностью визуального учета результатов перспективным является их разработка и внедрение в лабораторную практику, что будет способствовать совершенствованию надзора за возбудителем холеры.

**Цель работы** – создать набор пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител, направленных к O-антигену холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, для их идентификации и дифференциации методами прямого планшетного ИФА и дот-иммуноанализа.

**Задачи исследования:**

1. Восстановить из замороженного состояния гибридомы-продуценты видоспецифических МКА, направленных к O-антигену *V. cholerae* O1, O139, реклонировать их и провести многократное пассирование *in vitro* и *in vivo* для накопления препаративных количеств МКА.
2. Расширить спектр имеющихся гибридом за счет получения новых, продуцирующих МКА к поверхностным антигенам *V. cholerae* O1 и O139, охарактеризовать их изотип, эпитопную направленность, отсутствие перекрестной активности внутри вида, рода.
3. Выделить из асцитических (АЖ) и культуральных (КЖ) жидкостей моноклональные антитела, провести очистку, оценить специфичность в иммунологических методах на наборе штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и представителях близкородственных микроорганизмов, определить их диагностическую значимость.
4. Оптимизировать применительно к МКА биотехнологическую схему получения пероксидазных конъюгатов, оценить специфичность меченых антител в иммуноблоттинге. Нарботать экспериментальные серии пероксидазных препаратов и подобрать оптимальные условия их лиофилизации и стабилизации.
5. Отработать режимы постановки экспресс-метода идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп для прямого планшетного ИФА и дот-ИФА с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов в стационарных и полевых условиях (без приборного оснащения).

6. Провести лабораторные испытания экспериментальных серий лиофилизированных видоспецифических пероксидазных конъюгатов ПХ-МКА О1 и ПХ-МКА О139 на наборе штаммов холерных вибрионов О1, О139, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Определить место их использования в схеме лабораторной диагностики холеры.

**Научная новизна и теоретическая значимость работы:**

Получены новые гибридомы, продуцирующие МКА, направленные к эпитопам поверхностных антигенов холерных вибрионов О1, О139 серогрупп, и методом иммуноблоттинга показано, что они выявляют белки с молекулярной массой 38-42 кДа, входящие в состав общей мембранной фракции.

Оформлена заявка № 2017127677 (приоритет от 1.08.2017 г.) на изобретение «Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus Musculus* – продуцент моноклонального антитела к мембранному белку, общему для *tcp+* штаммов холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп».

На основе иммунохимического анализа штаммов холерных вибрионов О1, О139 серогрупп с различными генетическими маркерами полученные МКА, отличающиеся специфической направленностью, разделены на две группы: 1-я – выявляет штаммы *V. cholerae* О1 и О139 с генотипом *ctxA+tcpA+* и *ctxA-tcpA+*, 2-я - выявляет все штаммы *V. cholerae* О1 и О139, независимо от наличия генов *ctxA* и *tcpA*.

Сформирована панель МКА, включающая видоспецифические моноклональные антитела к О-антигену *V. cholerae* О1, О139 и антитела к белкам наружной мембраны, для тонкого эпитопного анализа поверхностных антигенов холерных вибрионов и оценки их иммунобиологических свойств.

Впервые, с учетом особенностей МКА, оптимизированы общие принципы и методологические приемы изготовления моноклональных пероксидазных конъюгатов к антигенам *V. cholerae* О1 и О139, заключающиеся в выделении активной фракции иммуноглобулинов, выборе оптимальных буферных растворов и оптимального соотношения пероксидазы хрена и иммуноглобулинов, применении БСА (бычьего сывороточного альбумина) в качестве стабилизатора в процессе лиофилизации.

Впервые, на основе видоспецифических МКА получены пероксидазные конъюгаты, предназначенные для обнаружения и дифференциации штаммов *V. cholerae* О1 и О139; на основе МКА к мембранным белкам сконструированы пероксидазные конъюгаты, с помощью которых в прямых методах ИФА возможно выявление холерных вибрионов с генотипом *ctxA+tcpA+* и *ctxA-tcpA+*.

В результате экспериментальной работы установлена сопоставимая диагностическая ценность дот-ИФА и классической иммуноферментной реакции на пластике. Показано, что моноклональные препараты предназначены для обнаружения и дифференциации штаммов *V. cholerae* О1 и О139 прямым методом планшетного ИФА и дот-ИФА как в стационарных, так и полевых условиях (без приборного оснащения). Их применение исключает возможность перекрестных реакций с представителями близкородственных микроорганизмов, необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов, сокращает общее время анализа до 70 минут.

Создание пероксидазных конъюгатов на основе МКА для постановки прямых вариантов ИФА позволяет расширить спектр моноклональных диагностических препаратов, используемых в мониторинге за холерой, что будет способствовать повышению качества и достоверности лабораторного анализа.

#### **Практическая значимость работы:**

Получен патент на гибридому, стабильно продуцирующую МКА к видоспецифическим эпитопам возбудителя холеры O1 серогруппы, № 2425874 «Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. musculus* L-продуцент моноклональных антител, специфичных к O-антигену холерных вибрионов O1 серогруппы» (опубликован 13.04.2010 г.)

В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk) депонированы две гибридомы-продуценты МКА: GX-H2F6/Omp (Свидетельство о депонировании № 179 от 12.12.2016), GX-A5D8/Omp (Свидетельство о депонировании № 180 от 12.12.2016), синтезирующие диагностически значимые моноклональные антитела к эпитопам мембранных белков холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Штаммы могут быть использованы при создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации *V. cholerae* O1/O139 (*tcpA*<sup>+</sup>) и иммунохимического анализа белков наружных мембран.

По результатам проведенных исследований оформлены нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению) на Набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА», одобренные Ученым советом института (протокол № 10 от 5.12.2016 г.)

На основе результатов лабораторных испытаний составлен и утвержден директором института Акт внедрения Набора реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» № 1041/1-16-10 от 02.09.2016 г.

Ростовский противочумный институт как Референс-центр по мониторингу за холерой, использует диагностические препараты на основе МКА: для слайд-агглютинации, прямой иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа, что позволяет повысить специфичность серологических методов и исключить перекрестную активность с представителями близкородственных, в том числе *V. cholerae* не O1/не O139, и гетерологичных микроорганизмов.

**Методология и методы исследования.** В работе использовались различные методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), гибридная технология (биоинженерия), методы иммунохимии (ИФА, дот-ИФА, иммуноблоттинг), биохимические и микроскопические.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Создание широкого набора гибридом-продуцентов обеспечивает получение диагностически значимых, стандартных, воспроизводимых МКА, узнающих

видоспецифические эпитопы О-полисахарида и поверхностные детерминанты белковой природы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, позволяет конструировать диагностические препараты нового поколения. Этот же набор МКА дает возможность проводить тонкий анализ антигенов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп различными иммунологическими методами.

2. Для создания диагностических препаратов можно использовать иммуноглобулины, выделенные как из асцитической жидкости (АЖ), так и культуральной жидкости (КЖ) с помощью различных методов.
3. Разработанная биотехнологическая схема экспериментально-производственного изготовления пероксидазных конъюгатов на основе МКА к ЛПС и белковым антигенам холерных вибрионов O1, O139 серогрупп позволяет получать высокоспецифичные и стандартные препараты.
4. Видоспецифические диагностические холерные O1, O139 МКА к ЛПС, меченные пероксидазой хрена, могут быть использованы для детекции холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в иммунологических методах: ИФА, дот-ИФА. Моноклональные пероксидазные конъюгаты к белковым антигенам с мол. массой 38-42 кДа могут быть применены для выявления штаммов *V. cholerae* O1 и O139 с генотипом *tcpA+*.
5. Широкая апробация набора диагностических МКА, меченных пероксидазой хрена, показала, что они обеспечивают выявление прямым методом ИФА и дот-ИФА холерных вибрионов O1, O139 серогрупп как в стационарных так и полевых условиях (без приборного обеспечения). В схеме лабораторной диагностики холеры препараты могут быть использованы при исследовании клинического материала и проб воды после выделения чистой культуры для подтверждения серогруппы холерных вибрионов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности результатов диссертационной работы основана на достаточном количестве наблюдений и использовании большого фактического материала, полученного с помощью современных методов исследования и наглядно представленного в таблицах и рисунках. Все данные получены в повторяющихся экспериментах, результаты обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Материалы диссертации представлены на конференции молодых ученых «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации» (г. Санкт-Петербург, 2014 г.); ежегодной Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (г. Ростов-на-Дону, 2014, 2015, 2016 гг.); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и практической медицины» (г. Ставрополь, 2014 г.); конференции молодых ученых ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора (г. Ростов-на-Дону, 2014 г.); VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); региональной конференции с сессией молодых ученых «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными

инфекциями» (г. Нижний Новгород, 2016 г.); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (г. Новосибирск, 2016 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора "Современные проблемы эпидемиологии и гигиены" (МО, 2016 г.).

**Личный вклад автора в исследование.** Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных и информационного материала при планировании, определении цели работы, в постановке всех исследовательских задач, подготовке и проведении экспериментальных работ, активном участии в обработке, обсуждении и интерпретации всех полученных результатов, в подготовке публикаций, депонировании гибридных клеточных линий, оформлении патента на изобретение, подготовке нормативно-технической документации.

**Публикации и связь работы с научными программами.** По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, 3 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК РФ.

Работа выполнена в лаборатории гибридом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рамках плановой НИР № 152-4-12 «Создание видо- и серовароспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в реакции dot-иммуноанализа» (2012-2016 гг., № гос. регистрации 01201252078).

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 233 источника, в том числе зарубежных - 144, диссертация иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами.

## ОСНОВОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследований.** На этапе получения иммунных спленоцитов, накопления моноклональных антител *in vivo* и для приготовления подкормочного (фидерного) слоя клеток использовали самок инбредных белых мышей линии *BALB/c* и беспородных белых мышей массой 16 - 20 грамм в возрасте 6 – 10 недель.

В работе использовали 94 штамма *V. cholerae* O1 (из них 13 – низкоагглютинабельные), 34 штамма *V. cholerae* O139, 18 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, 7 штаммов *V. cholerae* RO. С целью контроля специфичности препаратов МКА также использовали 5 штаммов *V. parahaemolyticus*, 2 – *E. coli*, 2 – *Brucella spp.*, 2 – *Salmonella spp.*, 4 – *Aeromonas*. Культуры были получены из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Использовали препараты ЛПС *V. cholerae* O1 5879 (ЛПС O1), *V. cholerae* O139 P-16064 (ЛПС O139), полученные по Westphal O. *et al.* (1965) и любезно предоставленные научным сотрудником Ларионовой Л.В. лаборатории диагностики ООИ Ростовского противочумного института, суммарные фракции белков наружных мембран, выделенные из бактериальной массы штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп по методу Lohia A. *et al.* (1984) и Chakrabarti S.R. *et al.* (1996) и любезно



предоставленные ведущим научным сотрудником Ростовского противочумного института Мишанькиным Б.Н.

Гибридизацию клеток проводили в соответствии с методикой Fazekas de St. *et al.* (1980) с помощью сливающего агента - полиэтиленгликоля 1500 (Fluka, «Sigma-aldrich», США). Мышиные иммунные спленциты получали путем трехкратной (с интервалом 14 дней) внутрибрюшинной иммунизации бактериальной взвесью холерных вибрионов (штамм *V. cholerae El Tor 13020 ctxA+tcpA+*), прогретой 30 минут при температуре 100 °С, в дозе  $10^8 - 10^9$  микробных клеток (в ПАФ и НПАФ) на животного. Партнером для слияния служила миеломная линия РЗ-Х63/Ag8.653, дефектная по ферменту гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ) (из коллекции клеточных линий позвоночных института Цитологии, г. Санкт-Петербург). Клеточные линии и гибридомы-продуценты культивировали *in vitro* в жидких питательных средах RPMI-1640 («Gibco») и DMEM («Gibco») с добавлением 10-20 % сыворотки плода коровы («HyClone»), 2 мМ глутамина («Serva»), 120 мкг/мл гентамицина. Для скрининга гибридом отбирали культуральные жидкости (КЖ) из лунок с хорошо выросшими клонами (10-14 день от начала гибридизации) и тестировали их в ИФА. Клонирование и реклонирование гибридных культур осуществляли методом предельных разведений (Underwood P.A. *et al.*, 1988) в 96-луночных планшетах с фидерным слоем клеток.

Продуцентами видоспецифических МКА-О1 и МКА-О139 служили гибридомы, полученные ранее в лаборатории гибридом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и находящиеся на постоянном хранении в сосудах Дьюара с жидким азотом при -196°С. Гибридомы депонированы в «Специализированной коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных» Института Цитологии (г. Санкт-Петербург) под номером РККК (П) 386Д и РККК (П) 674Д.

Гибридомы-продуценты культивировали *in vivo* в организме беспородных и линейных мышей Balb/c, предварительно праймированных пристаном (Sigma-Aldrich, США): внутрибрюшинно вводили  $10^7$  клеток на мышшь (Свиридов В.В. с соавт., 1986). Асцитическую жидкость из брюшной полости отбирали по мере формирования опухолей через 2 – 4 недели.

Источником специфических МКА служили культуральные супернатанты гибридом и асцитические жидкости мышей, из которых выделяли иммуноглобулиновую фракцию преципитацией сульфатом аммония (Reik L.M., 1987; Фримель Г., 1987; Кэтти Д., 1991).

Конъюгацию очищенных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена ( $RZ >3$ , акт  $>250$  ед/мг, хромат. чист, обессол, для иммунологии, «ДИА-М») проводили по методу Nakane P.K., Kawaoi A.J. (1974) с модификациями.

Для изучения свойств МКА применяли различные серологические методы: твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), дот-иммуноанализ (ДИА, дот-ИФА), реакцию агглютинации (РА), реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакцию преципитации (РП). Для изучения эпитопной направленности панели МКА проводили электрофорез бактериальных взвесей по методу Laemmli U.K. (1970) на

приборе Tetra Mini Protean (Bio-Rad), постановку иммуноблоттинга осуществляли по методу Towbin H. *et al.* (1984).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли общепринятыми методами (Ашмарин И.П., 1962), вычисляя среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической и доверительный интервал. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием критерия Стьюдента, различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Гибридомы-продуценты МКА к антигенам *V. cholerae* O1 и O139

Получение и выведение в массовую культуру гибридом, продуцирующих МКА к поверхностным антигенным детерминантам *V. cholerae* O1 и O139. Начальный этап работы был направлен на получение гибридом-продуцентов МКА, узнающих поверхностные антигенные детерминанты *V. cholerae* O1. В качестве иммуногена использовали взвесь клеток холерных вибрионов, убитых при 100°C в течение 30 мин. В результате нескольких опытов по гибридизации и скрининга отобрано 9 гибридных клонов, которые при длительном культивировании (6-8 недель) сохраняли стабильную антителопродукцию и хорошие ростовые свойства.

Привлечение в работу методов ИФА, дот-ИФА, электрофореза и иммуноблоттинга позволило установить специфичность полученной панели МКА и локализацию узнаваемых иммуноглобулинами антигенных детерминант. Вначале в ИФА определяли частоту представленности антигенных детерминант, узнаваемых соответствующими им МКА, в составе поверхностных структур широкого набора штаммов холерных вибрионов. Культуры *V. cholerae* O1, O139 из коллекции музея живых культур института, выделенные от человека и из объектов окружающей среды, отличались по наличию генов *ctxA* и *tcpA* (табл. 1).

Таблица 1 - Оценка специфичности полученных МКА на штаммах холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в непрямом ИФА

№ П/П	Штаммы <i>V. cholerae</i> (обеззараженные кипячением)	МКА гибридом (КЖ 1:100)								
		H2F6	A5D8	E5F5	G3F5	B3A5	A5B6	D6	F11H2	4F5
1	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA+tcpA+</i>	8/8*	8/8	8/7	8/7	8/8	8/8	8/8	8/7	8/8
2	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA-tcpA+</i>	8/8	8/8	8/7	8/7	8/8	8/8	8/8	8/7	8/8
3	<i>V. cholerae</i> El Tor <i>ctxA-tcpA-</i>	8/0	8/8	8/0	8/0	8/8	8/0	8/8	8/0	8/8
4	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA+tcpA+</i>	5/5	5/5	5/4	5/4	5/5	5/5	5/5	5/4	5/5
5	<i>V. cholerae</i> O139 <i>ctxA-tcpA-</i>	6/0	6/6	6/1	6/1	6/6	6/0	6/6	6/1	6/6
6	<i>E. coli</i>	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0	3/0
7	<i>V. cholerae</i> не O1/не O139	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
8	<i>Aeromonas spp.</i>	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
9	<i>Salmonella spp.</i>	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0
10	<i>Brucella spp.</i>	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0

Примечание: « \* » - отношение числа исследованных штаммов к числу штаммов, положительно взаимодействующих с МКА.

Согласно результатам ИФА, определяющим для условного разделения МКА на группы явилось наличие или отсутствие у вибрионов только гена *tcpA*. По этому критерию в 1-ую группу входят МКА гибридом H2F6, F11H2, G3F5, E5F5, A5B6, вступающие в реакцию со штаммами *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 с генотипом *tcpA*+ независимо от источника выделения. Эти же МКА не взаимодействуют с холерными вибрионами, лишенными гена *tcpA*. Во вторую группу входят МКА гибридом A5D8, B3A5, D6, 4F5, у которых зарегистрирована положительная реакция со штаммами *V. cholerae* O1, O139, независимо от наличия гена *tcpA*. Отсутствие перекрестной активности с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов – свидетельство специфичности МКА в отношении холерных вибрионов O1/ O139 серогрупп.

*Изучение эпитопной направленности моноклональных антител методом ИФА и иммуноблоттинга.* Для определения химической природы антигенных детерминант, узнаваемых МКА и их эпитопной направленности, мы использовали препараты ЛПС штаммов *V. cholerae* El Tor 5879 (ЛПС O1) и *V. cholerae* O139 P-16064 (ЛПС O139). При постановке ИФА, где на твердую фазу сенсibilизировали препараты ЛПС, у всех полученных МКА зарегистрирована отрицательная реакция. В качестве положительного контроля использовали МКА гибридомы РККК (П) 386Д, направленные к эпитопам O-антигена ЛПС холерных вибрионов O1 серогруппы, и МКА гибридомы РККК (П) 674Д, направленные к детерминантам ЛПС *V. cholerae* O139. Отсутствие специфической реакции исследуемых МКА с ЛПС O1 и O139 холерных вибрионов установлено и в иммуноблоттинге с клеточными лизатами, так как окрашенные зоны, характерные для ЛПС, не были выявлены на нитроцеллюлозной мембране. Из полученных результатов следует, что поверхностные антигенные детерминанты, к которым направлены исследуемые МКА, не принадлежат ЛПС.

Для установления природы и локализации антигенных детерминант, выявляемых комплементарными им МКА, также провели иммуноблоттинг с клеточными лизатами штаммов *V. cholerae* El Tor 13020 (*ctxA+tcpA+*) и 19435 (*ctxA-tcpA-*) (рис.1).

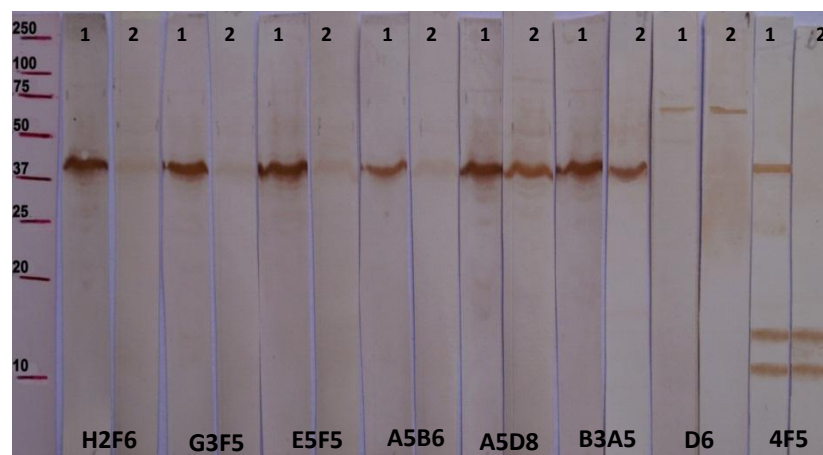


Рисунок 1 - Иммуноблоттинг МКА H2F6, G3F5, E5F5, A5B6, A5D8, B3A5, D6, 4F5 с бактериальными лизатами: 1- *V. cholerae* El Tor 13020 (*ctxA+tcpA+*), 2 - *V. cholerae* El Tor 19435 (*ctxA-tcpA-*).

Как видно, МКА гибридом H2F6, G3F5, E5F5, A5B6 взаимодействовали только с эпитопами штамма *V. cholerae* El Tor 13020 (*ctxA+tcpA+*), образуя интенсивную полосу на уровне маркерных белков 38-42 кДа; у штамма *V. cholerae* El Tor 19435 (*ctxA-tcpA-*) аналогичные эпитопы не выявлены, что является основанием для их дифференциации. В этой же зоне локализованы другие эпитопы, выявляемые МКА A5D8 и B3A5, и представленные у штаммов *V. cholerae* O1 и O139, независимо от наличия гена *tcpA*. МКА гибридомы D6 узнает «свою» антигенную детерминанту в виде тонкой полосы на уровне 60-65 кДа. МКА гибридомы 4F5 у штамма *V. cholerae* El Tor 13020 (*ctxA+tcpA+*) выявляет эпитоп, представленный тремя полосами, соответствующими 38-42 кДа, 14 кДа и 10 кДа.

Иммуноблоттинг МКА 1-ой группы с клеточным лизатом *V. cholerae* O139 16064 (*ctxA+tcpA+*) показывает характерную особенность - на блотограмме выявляются помимо основной интенсивной полосы 38-42 кДа несколько полос в диапазоне 20-37 кДа (рис. 2), что указывает на возможность существования отдельных фрагментов, в структуре которых представлены сходные антигенные детерминанты.

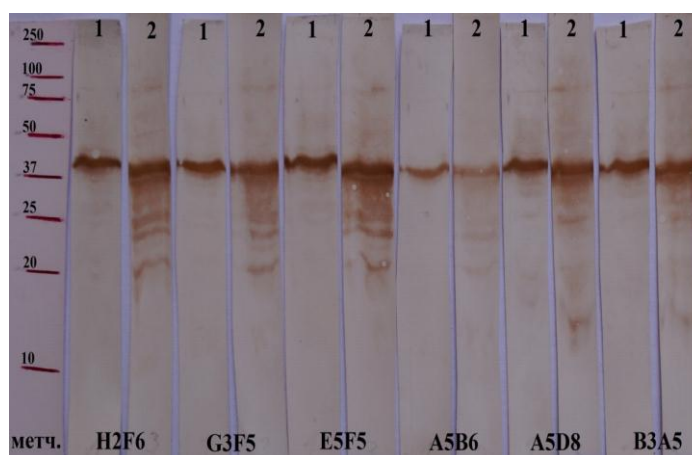


Рисунок 2 - Иммуноблот МКА H2F6, G3F5, E5F5, A5B6, A5D8, B3A5 с бактериальными лизатами: 1- *V. cholerae* El Tor 13020 (*ctxA+tcpA+*), 2 - *V. cholerae* O139 16064 (*ctxA+tcpA+*).

Отечественные авторы (Николаев В.Б. с соавт., 2007) при исследовании полипептидного профиля наружных мембран вирулентных и авирулентных штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп установили, что полипептиды с молекулярной массой 35-46 кДа имеются у всех штаммов *V. cholerae* O1 и O139, обуславливая характерный вид электрофореграмм. Из всего состава мажорных белков наружных мембран (БНМ) наибольшим уровнем экспрессии отличаются белки, мигрирующие в виде комплекса полипептидов с молекулярной массой 37-42 кДа. После проведения электрофореза и переноса белков из геля на НЦМ, мембрана была окрашена красителем Ponceau S, в результате чего у всех трёх штаммов визуализировалась интенсивная белковая полоса на уровне 38-42 кДа. В результате обработки НЦМ моноклональными антителами на блотограмме обнаружены интенсивные полосы 38-42 кДа. В связи с этим мы полагаем, что полученные нами МКА специфически

взаимодействуют с определенными белками наружных мембран. С другой стороны, поскольку МКА 1-й группы дифференцируют *tcpA+* и *tcpA-* холерные вибрионы, логично было бы полагать, что МКА направлены к эпитопам белка токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТКПА). Однако данные литературы свидетельствуют, что молекулярная масса основной структурной субъединицы пилей ТсрА - 20,5 кДа (Taylor R.K. *et al.*, 1987), тогда как различия между холерными штаммами *tcpA+* и *tcpA-* наблюдаются в отношении белков 38-42 кДа. У холерных вибрионов имеется еще 9 специфичных протеинов, кодируемых генами, локализованными в *tcp* опероне, из них описаны три белка: ТсрF, ТсрС и ТсрQ. Известно, что молекулярная масса белка ТсрQ составляет 15 кДа (Bose N. and Taylor R.K., 2005); белок ТсрF представлен двумя субъединицами 33 и 36 кДа (Kirn T. J. *et al.*, 2003), которые в электрофорезе и иммуноблоттинге не обнаруживаются в цельноклеточном лизате, а визуализируются в супернатанте (Kirn T.J. and Taylor R.K., 2005); ТсрС состоит из короткого сигнального пептида длиной 16 аминокислот и зрелого пептида с м.м. 52 кДа (Petersen T.N. *et al.*, 2011). Основываясь на этих данных, мы сделали вывод, что МКА 1-й группы направлены не к белкам, кодируемым генами *tcp* оперона.

Среди белков наружных мембран наибольший интерес представляют OmpT и OmpU, соответственно с молекулярной массой 40 и 38 кДа (Kelley J.T. *et al.*, 1981; Chakrabarti S.R. *et al.*, 1996). Мы предполагаем, что в имеющемся у нас наборе есть МКА, направленные к эпитопам белков OmpT или OmpU. Последние являются протеинами, участвующими в образовании пор во внешней мембране, способствующими поступлению питательных веществ, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, гидролитическим ферментам, солям желчных кислот и другим стрессовым воздействиям.

Повышенного интереса в первую очередь заслуживают гибридомы 1-й группы, которые продуцируют МКА к эпитопам, локализованным на поверхности холерных вибрионов O1/O139 серогрупп, имеющих ген *tcpA*, т.е. они позволяют выявлять штаммы, содержащие этот ген. В дальнейшей работе использовали гибридому-продуцент H2F6, т.к. она синтезирует МКА, эффективно взаимодействующие со всеми представленными в таблице 1 штаммами холерных вибрионов O1/O139 серогрупп с генотипом *tcpA+*, МКА не имеют перекрестной активности с близкородственными и гетерологичными микроорганизмами, гибридома при культивировании в условиях *in vitro* показала наилучшие ростовые свойства и высокую продукцию иммуноглобулинов. Эпитопную направленность МКА H2F6 исследовали в иммуноблоттинге также и в отношении общей мембранной фракции, выделенной из штаммов холерных вибрионов с различной генетической характеристикой (рис. 3). В результате обработки мембраны моноклональными антителами H2F6 установлено, что они выявляют белковую полосу в районе маркеров 40 кДа у штаммов, имеющих ген *ompT*. У штаммов, у которых отсутствовал ген *ompT*, аналогичная белковая полоса не выявлена. Таким образом, мы полагаем, что гибридома H2F6 продуцирует моноклональные антитела, направленные к эпитопам мембранного белка OmpT.

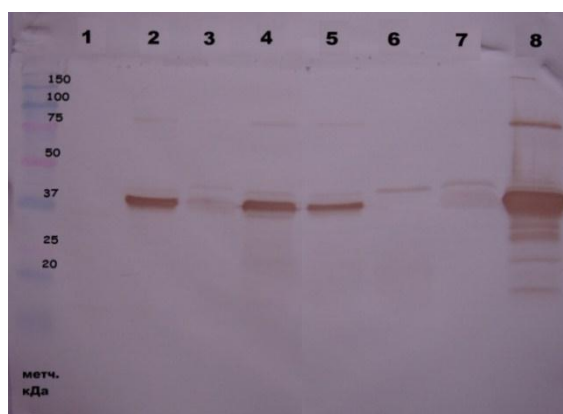


Рисунок 3. Иммуноблот МКА Н2F6 с общей фракцией белков наружных мембран штаммов холерных вибрионов O1, O139:

- 1- *V. cholerae* 17781 ( $\Delta ompT ompU ompW toxR \Delta ctx \Delta tcpA$ ); 2- *V. cholerae* 16073 (*ompT ompU ompW toxR ctx tcpA*); 3- *V. cholerae* 14280 ( $\Delta ompT ompU ompW toxR \Delta ctx \Delta tcpA$ ); 4- *V. cholerae* 5879 (*ompT ompU ompW toxR ctx tcpA*); 5- *V. cholerae* 569-B (*ompT ompU ompW toxR ctx tcpA*); 6- *V. cholerae* 18948 ( $\Delta ompT ompU ompW toxR \Delta ctx \Delta tcpA$ ); 7- *V. cholerae* 14172 ( $\Delta ompT ompU ompW toxR \Delta ctx \Delta tcpA$ ); 8- *V. cholerae* 1310 (*ompT ompU ompW toxR ctx tcpA*).

В результате проведенной работы депонированы две гибридомы-продуценты в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»: гибридома ГХ-Н2F6/Omp (Свидетельство о депонировании в «ГКПМ-Оболенск» № 179 от 12.12.2016), гибридома ГХ-А5D8/Omp (Свидетельство о депонировании в «ГКПМ-Оболенск» № 180 от 12.12.2016). Как нам представляется, такие антитела ценны как в диагностическом плане, так и для эпитопного анализа белков наружных мембран и их иммунобиологических свойств.

*Накопление, выделение и очистка специфических иммуноглобулинов.* Для разработки препаратов, а это одна из задач работы, требовалось накопить специфические антитела, поэтому были проведены опыты по получению препаративных количеств МКА в виде КЖ и АЖ. Используемые в работе гибридомы-продуценты РККК (П) 386Д и РККК (П) 674Д, синтезирующие МКА к О-антигену *V. cholerae* O1 и соответственно, O139, полученные ранее в лаборатории и постоянно хранящиеся в жидком азоте, выводили из криоконсервированного состояния и адаптировали к условиям культивирования.

Выделение и очистку МКА из культуральных и асцитических жидкостей проводили с помощью известного метода осаждения антител - высаливание белков насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом. При сравнении данных количественного выхода специфических иммуноглобулинов до и после очистки был сделан вывод, что используемый метод позволяет выделять антитела с наименьшими потерями (по белку). Титры очищенных МКА из КЖ в непрямом ИФА составляли 1:16000-1:32000 и из АЖ - 1:100000-1:200000. Полученные результаты позволяют говорить о том, что КЖ являются полноценным источником иммуноглобулинов при условии культивирования гибридом *in vitro* до стадии максимального антителообразования.

## Получение моноклональных пероксидазных конъюгатов

Оптимизация условий получения пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител, направленных к О-антигену *V. cholerae* O1 и O139. Технология получения моноклонального пероксидазного конъюгата состояла из нескольких этапов: активация ПХ; иммобилизация активированной ПХ с Ig; очистка от не связавшихся компонентов; хранение и контроль (рис. 4). Были подобраны оптимальные условия конъюгации, а именно молекулярные соотношения Ig и ПХ, а также pH реакционной смеси. Модификация известной схемы конъюгирования состояла в том, что был введен дополнительный этап - доведение активированной пероксидазы хрена и препарата МКА до pH 9,5 диализом против 0,2 М раствора КББ при +4°C в течение 15-30 мин.

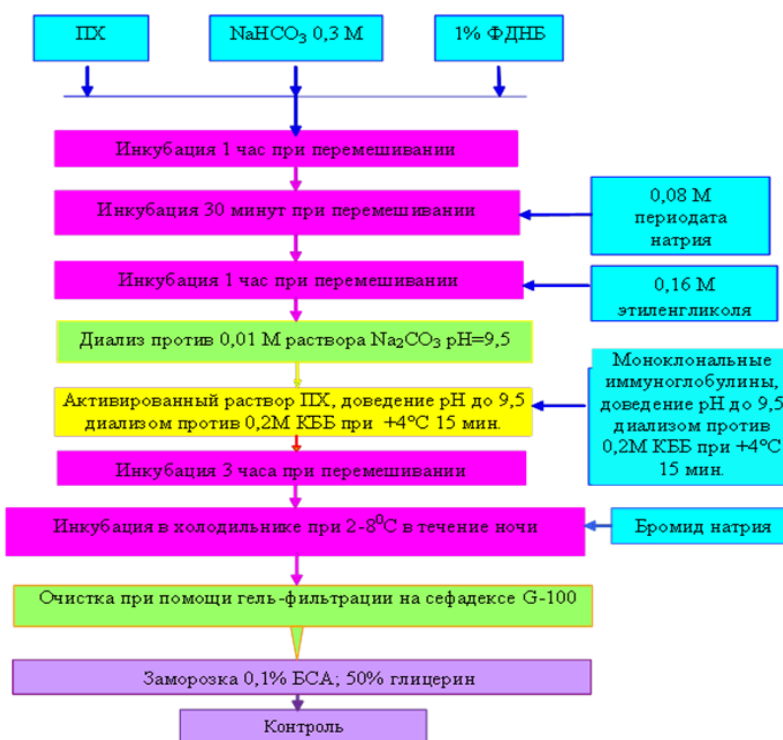


Рисунок 4 - Схема получения моноклонального пероксидазного конъюгата.

Описаны различные методы конъюгирования МКА с ПХ, в которых используются разные молекулярные соотношения Ig и ПХ (Егоров А.М. с соавт., 1991). Согласно методике Nakane P.K., Kawaoi A.J. (1974), пероксидазу конъюгировали с антителами 1:1 по белку. Нами апробировано 4 варианта этого соотношения: 1:1, 1:2, 1:4, 2:1. Активность полученных конъюгатов исследовали методом прямого ИФА и дот-ИФА. Для каждого конъюгата проверяли способность связываться со специфическим антигеном и способность к неспецифической сорбции. Было установлено, что наиболее оптимальным является соотношение ПХ и Ig 1:2, т.к. в этом случае получены конъюгаты ПХ-O1 и ПХ-O139 с рабочим титром, равным 1:128-1:256. Иммуноблоттинг

с клеточными лизатами штаммов *V. cholerae* O1 и O139 показал отсутствие перекрестной активности конъюгатов, что является характеристикой их специфичности.

Очистку конъюгатов проводили методом гель – фильтрации на сефадексе G-100. Когда пропускали через колонку, то конъюгат выходил в виде отдельных фракций. Анализ специфической активности конъюгатов ПХ-МКА O1 и ПХ-МКА O139 в отношении соответствующих групп холерных вибрионов, показал, что в обоих случаях она максимально представлена в 1-ой фракции.

*Наработка экспериментальных серий холерных видоспецифических пероксидазных конъюгатов для испытания на широком наборе штаммов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов и подготовка нормативно-технических документов.* По отработанной схеме мы приготовили экспериментальные образцы (3 серии) моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 в иммуноферментных методах. Рабочие разведения конъюгатов определяли двукратным шагом титрования в двухкомпонентной реакции: исследуемый Антиген+МКА, меченные ферментом. Постановку ИФА осуществляли прямым методом в 96-луночных плоскодонных или U-образных планшетах. Было установлено, что титры ПХ-МКА O1 в зависимости от серии составляют 1:64-1:128, ПХ-МКА O139 - 1:128-1:256. Определение чувствительности метода прямого ИФА с использованием пероксидазных конъюгатов показало, что она находится на уровне  $10^6$  м.к/лунку.

Жидкие препараты расфасовывали по 1 мл в стеклянные флаконы емкостью 5 мл с резиновыми пробками и замораживали. В качестве стабилизатора использовали бычий сывороточный альбумин (BSA, Biotechnology Grade, Amresco) в концентрации 0,1 %. Далее проводили лиофильное высушивание пероксидазных конъюгатов (сушка Heto PowerDry PL9000, Thermo Scientific, Дания) в течение 11 часов, плавно изменяя температуру сушки с  $-25^{\circ}\text{C}$  до  $+30^{\circ}\text{C}$ . Высушенные препараты герметично закупоривали резиновыми пробками, завальцовывали алюминиевыми колпачками и хранили при  $+4^{\circ}\text{C}$ .

В число задач данной работы входило приготовление экспериментальных серий лиофильно-высушенных диагностических препаратов (рис. 5):



Рисунок 5 - Фотоизображение экспериментальных серий препаратов:

- 1) Иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O1, меченные пероксидазой хрена, сухие; 2) Иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O139, меченные пероксидазой хрена, сухие.



Экспериментальные серии лиофильно-высушенных пероксидазных конъюгатов были сформированы в Набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» («Иг - *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА»), который включает в себя: 1) Иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O1, меченные пероксидазой хрена, сухие; 2) Иммуноглобулины моноклональные диагностические холерные O139, меченные пероксидазой хрена, сухие; 3) Нитроцеллюлозная мембрана для нанесения образцов (10 полос 5\*1 см, Bio-Rad); 4) Карбонат-бикарбонатный буфер, таблетки для растворения (1 табл./50 мл, pH 9.6, 0.05M, Биолот); 5) Фосфатно-солевой буфер с твином, жидкий концентрат x20 (26 мл «НВО Иммунотех»); 6) Инструкция по применению; 7) Аналитический паспорт на поставляемую серию набора.

На медицинское изделие разработаны нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению), утвержденные Ученым советом института (протокол № 10 от 5.12.2016 г.).

Для оценки диагностической значимости моноклональных конъюгатов были проведены лабораторные испытания. Специфическую активность экспериментальных серий Набора реагентов исследовали на музейных штаммах (табл. 2).

Результаты ИФА показали, что из всех исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 с нагрузкой антигена  $10^8$  м.к./лунку при взаимодействии с конъюгатом ПХ-МКА O1 положительная реакция зарегистрирована у 94 (100%) штаммов, в том числе и низкоагглютинабельных. У большей части культур значения ОП находились в диапазоне 1,0-2,0 ед., что говорит о высокой частоте представленности на поверхности вибрионов эпитопов O-антигена, к которым направлены МКА гибридомы РККК (П) 386Д. При нагрузке антигена  $10^6$  м.к./лунку конъюгат ПХ-МКА O1 выявлял 80 % штаммов *V. cholerae* O1. Конъюгат ПХ-МКА O139 при взаимодействии с культурами *V. cholerae* O139 ( $10^8$  м.к./лунку) выявлял 100% штаммов, у большей части из них зарегистрированы значения ОП в диапазоне 1,0-2,0 ед., что также указывает на высокое содержание эпитопов O-139 антигена в составе поверхностных антигенов. Этот же конъюгат выявлял 88 % культур *V. cholerae* O139 при дозе клеток  $10^6$  на лунку. Важно отметить, что испытываемые конъюгаты не вступают в реакцию с холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп, поэтому для повышения достоверности анализа могут быть использованы в процессе мониторинга за холерой, особенно в случае выделения штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, агглютинирующихся холерными диагностическими сыворотками. Так, например, сотрудниками института проводилось сравнительное изучение биологических свойств холерных вибрионов не O1/не O139, циркулирующих в поверхностных водоемах и стоках г. Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год (Григоренко Л.В. с соавт., 2013). Было показано, что за указанный период среди выделенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 62% из них давали положительный результат в реакции слайд-агглютинации на стекле с диагностической O1 холерной сывороткой, а у 30% штаммов выявлена агглютинабельность и в развернутой реакции агглютинации с O1 холерной и типоспецифическими сыворотками в различных титрах.

Таблица 2 - Применение видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в прямом ИФА

№ п/п	Штаммы	Количество исследуемых	Количество штаммов, взаимодействующих с моноклональными пероксидазными конъюгатами					
			ПХ-МКА O1			ПХ-МКА O139		
			10 <sup>6</sup> м.к./лунку	10 <sup>8</sup> м.к./лунку		10 <sup>6</sup> м.к./лунку	10 <sup>8</sup> м.к./лунку	
			ОП 0,4-1,0 ед.	ОП 0,4-1,0 ед.	ОП 1,0-2,0 ед.	ОП 0,4-1,0 ед.	ОП 0,4-1,0 ед.	ОП 1,0-2,0 ед.
1	<i>V. cholerae</i> El Tor Inaba	22	20	2	20	-	-	
	<i>V. cholerae</i> El Tor Inaba ↓	7	-	7	-	-	-	
2	<i>V. cholerae</i> El Tor Ogawa	47	43	18	29	-	-	
	<i>V. cholerae</i> El Tor Ogawa ↓	6	-	6	-	-	-	
3	<i>V. cholerae</i> El Tor Hikoshima	2	2	1	1	-	-	
4	<i>V. cholerae cholerae</i> Inaba	5	5	1	3	-	-	
5	<i>V. cholerae cholerae</i> Ogawa	5	5	1	4	-	-	
6	<i>V. cholerae</i> O139 (от человека)	16	-	-		14	7	9
7	<i>V. cholerae</i> O139 (из воды)	18	-	-		16	8	10
8	<i>V. cholerae</i> O22	1	-	-		-	-	
9	<i>V. cholerae</i> RO	7	-	-		-	-	
10	<i>V. cholerae</i> не O1/не O139	18	-	-		-	-	
11	<i>V. parahaemolyticus</i>	5	-	-		-	-	
12	<i>E. coli</i>	2	-	-		-	-	
13	<i>Salmonella</i> spp.	2	-	-		-	-	
14	<i>Aeromonas</i> spp.	4	-	-		-	-	
15	<i>Brucella</i> spp.	2	-	-		-	-	

Примечание: 1) «ОП» – оптическая плотность, «-» - отрицательная реакция, «↓» - штаммы со сниженной агглютинабельностью холерными поликлональными диагностическими сыворотками (1/4-1/2 титра).

Специфическую активность моноклональных пероксидазных конъюгатов также исследовали в прямом варианте дот-ИФА (рис. 6). Отсутствие окрашенных пятен на НЦМ у представителей RO-штаммов, *V. cholerae* не O1/не O139, *V. cholerae* O22 - показатель отрицательной реакции дот-ИФА и свидетельство строгой специфичности конъюгатов.

Для установления сроков использования лиофилизированных препаратов, их специфическую активность (рабочий титр) проверяли через 6 месяцев, 1 и 1,5 года – она оставалась на исходном уровне (отмечалось лишь незначительное уменьшение показателей оптической плотности в пределах 0,1-0,2 ед.).



а



б

Рисунок 6 - Результаты взаимодействия пероксидазного конъюгата O1 (б) и O139 (а) с испытуемыми штаммами в дот-ИФА. Штаммы: 1 - 10 - *V. cholerae* O139 (от человека); 11 - 20 - *V. cholerae* O139 (из воды); 21 - 25 - *V. cholerae* O1; 26 - *V. cholerae* O22; 27 - *V. cholerae* RO; 28 - *V. parahaemolyticus*; 29 - *E. coli*; 30 - *Salmonella* sp; 31 - 46 - *V. cholerae* El Tor Inaba; 47 - 76 - *V. cholerae* El Tor Ogawa; 77 - 81 - *V. cholerae cholerae* Inaba; 82 - 86 - *V. cholerae cholerae* Ogawa; 87 - 91 - *V. cholerae* O139; 92 - *V. cholerae* O22; 93 - *V. cholerae* RO; 94 - *V. parahaemolyticus*; 95 - *E. coli*; 96 - *Salmonella* spp.

Получение пероксидазных конъюгатов на основе моноклональных антител, направленных к мембранным белкам, для детекции холерных вибрионов O1, O139 серогрупп с генотипом *tcpA*<sup>+</sup>. По отработанной схеме получали конъюгаты МКА Н2F6 с пероксидазой хрена. Рабочие титры конъюгатов равнялись 1:32 (серия 1) и 1:64 (серия 2) при отсутствии неспецифической сорбции. Специфичность полученных конъюгатов на основе МКА Н2F6 была оценена на наборе штаммов холерных вибрионов с генотипами *tcpA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>-</sup>, а также близкородственных и гетерологичных микроорганизмов (табл. 3).

Таблица 3 - Детекция холерных вибрионов O1/O139 серогрупп с помощью ПХ-МКА<sub>tcpA</sub><sup>+</sup> в прямом ИФА

№ п/п	Бактериальные штаммы (обеззараженные кипячением)	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, положительно взаимодействующих в ИФА с ПХ-МКА <sub>tcpA</sub> <sup>+</sup>
1	<i>V.cholerae cholerae tcpA</i> <sup>+</sup>	8	7
2	<i>V.cholerae El Tor tcpA</i> <sup>+</sup>	16	15
3	<i>V.cholerae El Tor tcpA</i> <sup>-</sup>	8	0
4	<i>V.cholerae</i> O139 <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	6	6
5	<i>V.cholerae</i> O139 <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	6	0
6	<i>E. coli</i>	2	0
7	<i>V.cholerae</i> не O1/не O139	4	0
8	<i>Aeromonas</i> spp.	4	0
9	<i>Salmonella</i> spp.	2	0
10	<i>Brucella</i> spp.	2	0

Из 30 исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 и O139 с генотипом *tcpA*<sup>+</sup> в прямом ИФА с пероксидазным конъюгатом Н2F6 положительно взаимодействуют 28 штаммов (93%). Кроме того выявлено, что исследуемые антитела взаимодействуют как с

клетками El Tor штаммов, так и классических холерных вибрионов, что указывает на сходство у этих биоваров антигенной детерминанты, к которой направлены МКА H2F6. Конъюгаты ПХ-МКА $tcpA+$  также исследовали в прямом дот-иммуоферментном анализе с набором штаммов, представленных в таблице 2. Независимо от наличия гена  $ctxA$ , моноклональный пероксидазный конъюгат в прямом ИФА и дот-ИФА выявлял среди исследуемых холерных вибрионов только штаммы с генотипом  $tcpA+$ . Отрицательная реакция зарегистрирована в отношении  $tcpA-$  штаммов *V. cholerae* O1, O139, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Лабораторно-экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе МКА к мембранным белкам предназначены для детекции  $tcpA+$  холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в прямых методах ИФА, в том числе и штаммов *V. cholerae* El Tor  $ctxA-tcpA+$ , которые безусловно представляют интерес. По данным Референс-центра по мониторингу за холерой, за период 2006-2015 гг. из воды поверхностных водоемов было изолировано 32 штамма *V. cholerae* O1  $ctxA-tcpA+$  в Ростовской области (2007 г. и 2015 г.), в Республике Калмыкия (2007, 2011-2015 гг.), в Алтайском (2011 г.) и Хабаровском (2013 г.) краях (Иванова С.М. с соавт., 2012- 2015; Гриднева Л.В. с соавт., 2014; Яшкулов К.Б. с соавт., 2015). Такие штаммы холерных вибрионов не обладают эпидемическим потенциалом, но могут вызывать единичные случаи заболеваний и локальные вспышки (Ростовская область, 2005 г., Республика Калмыкия, 2011 г.) (Онищенко Г.Г. с соавт., 2007; Титова С.В. с соавт., 2016).

#### **Применение МКА, меченых пероксидазой хрена, для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в ИФА и дот-ИФА.**

Одна из практических задач исследования заключалась в подборе оптимального режима постановки планшетного прямого ИФА и дот-ИФА с применением видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспрессного выявления холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп как в стационарных, так и в полевых условиях без приборного обеспечения. Мы сравнивали различные условия сорбции антигена в лунках полистироловых серологических планшет, а также температуру и время инкубации сенсibilизированного антигена с моноклональным пероксидазным конъюгатом.

Установлено, что в случае проведения прямого ИФА исследуемый антиген эффективно сенсibilизируется на пластике в течение 30 мин. при температурах 37°C и 20-25°C. Оптимальное время инкубации антигена с конъюгатом O1, O139 равняется 20 мин при 20-25°C. Такие параметры позволяют сократить время постановки ИФА до 70 мин. с учетом проявления реакции, при этом чувствительность метода остается на уровне  $10^6$  м.к.

Для оценки возможности использования прямого дот-ИФА как экспресс-метода диагностики холеры также подбирали оптимальный режим проведения этой реакции, а именно - сравнивали различные параметры инкубации мембраны с сенсibilизированным на ней антигеном в рабочем растворе конъюгатов. Было определено, что для специфического связывания антигена с конъюгатами недостаточно 20 минут инкубации, как в случае прямого планшетного ИФА. Так, для ПХ-МКА O1

время инкубации составляет 40 мин. будь то комн.  $t^{\circ}$  или  $37^{\circ}\text{C}$  (также можно инкубировать 40 мин. на шейкере при комн.  $t^{\circ}$ ), для ПХ-МКА О139 - 40 мин. на шейкере при комн.  $t^{\circ}$ . Общее время проведения анализа, как и в случае ИФА, находится в пределах 70 мин, при этом чувствительность метод сохраняется на уровне  $2 \cdot 10^6$  м.к.

### **ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Разработанные препараты применяются в процессе мониторинга холеры в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Так, в 2016 году в институте было исследовано 425 проб из воды открытых водоемов Ростовской области на контаминацию холерными вибрионами различных серогрупп. Выделено 4 нетоксигенные культуры, принадлежность которых к *V. cholerae* O1 была установлена в реакции слайд-агглютинации (с поликлональной агглютинирующей сывороткой и моноклональными антителами), реакции иммунофлуоресценции (с поликлональным препаратом и ФИТЦ-МКА), ПЦР и Maldi-Toff. Аналогичные результаты получены при использовании прямого ИФА и дот-ИФА с Набором реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена» (Акт внедрения № 1041/1-16-10 от 02.09.2016 г.). Выделенные холерные вибрионы идентифицировали как *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (*ctxA-tcpA*-). Также, набор реагентов может быть применен в условиях работы СПЭБ для детекции холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп прямым методом ИФА и дот-ИФА при исследовании проб из объектов окружающей среды и из клинического материала после подращивания во II пептоне; метод планшетного ИФА может быть применен и при исследовании нативного материала без предварительного подращивания при условии содержания в пробе холерных вибрионов в количестве не менее  $10^6$  м.к.

### **ВЫВОДЫ**

1. Панель МКА, созданная ранее к видоспецифическим эпитопам ЛПС O1, O139, расширена за счет новых гибридом-продуцентов МКА, направленных к эпитопам белков наружной мембраны холерных вибрионов O1, O139 серогрупп. На две из них (ГХ-А5D8/Оmp и ГХ-Н2F5/Оmp) получены свидетельства о депонировании в «ГКПМ-Оболенск» (№ 179, № 180 от 12.12.2016).
2. Панель МКА, узнающих эпитопы белков наружной мембраны в диапазоне мол. масс от 10 до 65 кДа, включает 2 группы антител: 1-я - Н2F6, F11Н2, G3F5, E5F5, A5B6 вступают в реакцию со штаммами *V. cholerae* O1, O139 с генотипом *tcpA*+ независимо от источника выделения, 2-я - А5D8, В3А5, D6, 4F5, взаимодействуют со штаммами *V. cholerae* O1, O139, независимо от наличия гена *tcpA*.
3. Многократное пассирование гибридом-продуцентов МКА, направленных к белковым и углеводным эпитопам поверхностных антигенов, в условиях *in vivo* и *in vitro* обеспечивает накопление КЖ и АЖ, из которых были выделены и очищены моноспецифические иммуноглобулины, отвечающие в полной мере диагностическим требованиям.

4. Модификация ряда этапов биотехнологической схемы получения пероксидазных конъюгатов позволила оптимизировать ее применительно к МКА и сконструировать диагностические препараты с рабочим титром 1:128-1:256, строго специфичных в отношении холерных вибрионов O1, O139 серогрупп.
5. Сформирован диагностический Набор «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» («Иг - *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА») на основе экспериментальных серий видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов, на который разработаны и утверждены Ученым советом института нормативно-технические документы (ТУ и Инструкция по применению, протокол № 10 от 5.12.2016 г.).
6. На основе МКА к эпитопам белков наружных мембран с мол. массой 38-42 кДа получены пероксидазные конъюгаты, которые позволяют выявлять холерные вибрионы O1/O139 серогрупп с генотипом *tcpA*+ в прямых методах иммуноферментного анализа.
7. Подобраны оптимальные режимы постановки ИФА и дот-ИФА в стационарных и полевых условиях (без приборного обеспечения) с применением видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов, позволяющие обнаружить холерные вибрионы O1, O139 серогрупп в течение 70 мин. в прямых вариантах иммуноферментного анализа при чувствительности  $10^6$  м.к./мл.
8. Лабораторными испытаниями широкого набора штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов в иммуноферментных методах подтверждена диагностическая ценность разработанных видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов. В схеме лабораторной диагностики холеры препараты могут быть использованы для обнаружения холерных вибрионов в пробах из объектов окружающей среды и из клинического материала после выделения чистой культуры для подтверждения серогруппы холерных вибрионов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Евдокимова, В.В.** Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1- и O139-серогруппы / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.С. Бурша // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. - № 3. – С. 51-57 (**из перечня ВАК**).
2. **Евдокимова В.В.**, Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.С. Бурша // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. - № 5. – С. 303-307 (**из перечня ВАК**).
3. **Евдокимова, В.В.** Изучение диагностических возможностей моноклональных антител, специфичных к мембранному белку возбудителя холеры, в иммуноферментном анализе / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, В.П. Зюзина,

- О.Ф. Кретенчук, М.Э. Яговкин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. - № 3 - С. 45-48. (из перечня ВАК).
4. Алексеева, Л.П. Новые препараты на основе моноклональных антител в лабораторной диагностике холеры / Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, **В.В. Евдокимова**, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону, 2014. - Вып. 27. – С. 156-160.
  5. **Евдокимова, В.В.** Моноклональные антитела к поверхностным антигенным детерминантам холерных вибрионов Эль Тор и их диагностическая значимость / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, О.С. Бурша, М.Э. Яговкин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону, 2014. - Вып. 27. - С. 122-126.
  6. **Евдокимова, В.В.** Перспективы применения препаратов на основе моноклональных антител в лабораторной диагностике холеры / **В.В. Евдокимова**, О.Ф. Кретенчук О.Ф., Л.П. Алексеева // Инфекция и иммунитет. – 2014. - № 1(4). – С. 64-65.
  7. **Евдокимова, В. В.** Аспекты применения моноклональных антител к терморезистентным поверхностным антигенным детерминантам холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, О.С. Бурша, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Ставрополь, 2014. – С. 78-79.
  8. Алексеева, Л.П. Совершенствование лабораторной диагностики холеры на основе моноклональных антител / Л.П. Алексеева, **В.В. Евдокимова**, О.Ф. Кретенчук, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская // Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней: Материалы международной научно-практической конференции. - Сочи, 2015. – С. 90-94.
  9. **Евдокимова, В.В.** Моноклональные антитела к иммунореактивным антигенам холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, О.С. Бурша, И.В. Архангельская // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28.- С. 164-168.
  10. **Евдокимова, В.В.** Изучение эпитопной направленности холерных моноклональных антител методом иммуноблоттинга / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. - Санкт-Петербург, 2015. – С.122-123.
  11. **Евдокимова, В.В.** Дот-иммуноферментный анализ в диагностике холеры / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева // Материалы межрегионального форума

- Специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни». МЗРФ. – Краснодар, 2016. - С. 88-90.
12. **Евдокимова, В.В.** Моноклональные пероксидазные конъюгаты и метод прямого dot-иммуноферментного анализа в диагностике холеры / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева // Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями: Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. - Нижний Новгород, 2016. – С. 149-152.
  13. **Евдокимова, В.В.** Применение моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления *tcp+* штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, М.Э. Яговкин // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2016. – Вып. 29. – С. 180-183.
  14. **Евдокимова, В.В.** Хранение и лиофилизация холерных моноклональных пероксидазных конъюгатов / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, Г.Г. Шубин, М.Э. Яговкин // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2016. – Вып. 29. – С. 183-185.
  15. **Евдокимова, В.В.** Применение препаратов на основе моноклональных антител для выявления *tcp+* штаммов *V. cholerae* O1 и O139 / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева // Современные проблемы эпидемиологии и гигиены: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Москва, 2016. – С. 70-71.
  16. **Евдокимова, В.В.** Диагностика холеры на основе препаратов нового поколения / **В.В. Евдокимова**, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук // Диагностика и профилактика инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции. – Новосибирск, 2016. – С. 151-153.