

УДК 616.9-074

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КОНСТРУИРОВАНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНА 200 KDA BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

<sup>1,2</sup>Замарина Т.В., <sup>1,2</sup>Храпова Н.П.<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»,  
Волгоград, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;<sup>2</sup>ГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: post@volgmed.ru

В работе подробно описаны критерии подбора компонентов для конструирования экспериментальной тест-системы иммуноферментной, позволяющей выявлять гликопротеин капсулы 200 kDa возбудителя мелиоидоза, характерный признак вирулентных штаммов *Burkholderia pseudomallei*. Панель моноклональных антител (МКА) против различных эпитопов этого антигена была охарактеризована с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител, реакции иммунодиффузии в геле, иммуноблоттинга. В ходе исследования были получены данные о конкурентных взаимоотношениях моноклональных антител, использованных в качестве антител первого порядка, определены константы их аффинности в реакции с контрольным образцом антигена. Изучены диагностические возможности полученной тест-системы в реакциях с водно-солевыми и экстрацеллюлярными экстрактами патогенных буркхолдерий. Результаты работы продемонстрировали эффективность применения МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза в качестве основы для изготовления изделия медицинского назначения – тест-системы для выявления патогенных буркхолдерий и их антигенов в различных объектах исследования.

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

## OPTIMIZATION OF DEVELOPING ENZYME IMMUNOASSAY SYSTEM FOR DETECTING ANTIGEN 200 KDA BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

<sup>1,2</sup>Zamarina T.V., <sup>1,2</sup>Khrapova N.P.<sup>1</sup>Volgograd Research Institute for Plaque Control, Volgograd, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru;<sup>2</sup>The Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: post@volgmed.ru

The article describes the criteria of the component selection for the development of an experimental ELISA kit which detects 200 kDa antigen *Burkholderia pseudomallei*, a basic feature of virulent *Burkholderia pseudomallei* strains. We characterized the panel of monoclonal antibodies against different epitopes of 200 kDa antigen of *Burkholderia pseudomallei* using indirect fluorescent assay and gel immunodiffusion, Western blot. We have also obtained data on the competitive relationship between the antibodies and the affinity constants. Then we examined the diagnostic capability of the ELISA kit in reactions with water-salt extracts and extracellular extracts of pathogenic *Burkholderia* spp. The results showed the efficacy of Mabs against 200 kDa antigen for the manufacture medical products including test systems for the detection of pathogenic *Burkholderia* spp and their antigens in a variety of objects.

**Keywords:** melioidosis, diagnosis, monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent method

На сегодняшний день вопросы совершенствования иммунодиагностических средств, направленных на обнаружение возбудителей особо опасных инфекций, в частности возбудителя мелиоидоза, приобретают все большую актуальность [4]. Наиболее приоритетным направлением совершенствования методов выявления возбудителя мелиоидоза является разработка средств обнаружения этого особо опасного микроорганизма, приготовленных на основе МКА. Использование МКА к диагностически значимой антигенной мишени патогенной буркхолдерии позволяет добиться таких параметров качества, как высокая чувствительность, специфичность изделия медицинского назначения и его стандартизация [3].

Для изготовления иммуноферментной тест-системы на основе МКА, отвечающей

современным требованиям, необходим тщательный подбор ингредиентов для каждого из этапов постановки сэндвич-варианта ИФА. Моноклональные антитела должны быть высокоаффинными и при этом не должны обладать кросс-реактивностью. В последние годы одной из приоритетных мишеней для обнаружения *B. pseudomallei* является экспонированный на поверхности микробных клеток гликопротеин с м.м. 200 kDa – маркер вирулентных штаммов буркхолдерий [5].

Данная работа посвящена изучению свойств МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, использованных для создания на их основе иммуноферментной тест-системы, способной выявлять искомый антиген в различных объектах.

Цель исследования. Подбор оптимальных ингредиентов (МКА) для сэндвич-варианта ТИФМ: антител первого порядка для сорбции на твердой фазе и антитела второго порядка для изготовления ИПК.

### Материалы и методы исследования

В работе были использованы линии мышинных перевиваемых гибридных клеток-продуцентов МКА против антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза из коллекции лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, постоянно сохраняемые в жидком азоте при  $-196^{\circ}\text{C}$  и инбредные белые мыши линии BALB/c, массой 12 – 16 г обоих полов.

Моноклональные антитела к гликопротеину 200 kDa различной эпитопной направленности накапливали в препаративных количествах в процессе культивирования *in vitro* и *in vivo*, последовательно размораживая все варианты гибридом-продуцентов [2]. Клетки культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  и 70–80% влажности с применением среды RPMI-1640 с добавлением 15% эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина, пирувата натрия. Антителопродукцию контролировали с помощью непрямого варианта ТИФМ по стандартной методике.

Накопление антител *in vivo* осуществляли с помощью внутрибрюшинного введения  $1-5 \cdot 10^6$  клеток гибридом мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном. МКА выделяли из асцитической жидкости (АЖ) мышей с помощью метода трёхкратного пересадения белка сульфатом аммония. Специфическую активность МКА оценивали в непрямом методе флюоресцирующих антител, подтверждали их гомогенность и видовую принадлежность с помощью реакции иммунодиффузии.

Изоотипы антител определяли с помощью набора реагентов фирмы SIGMA согласно прилагаемой инструкции (Antigen-mediated ELISA). Данные о конкурентных взаимоотношениях МКА были получены с помощью метода, описанного Friguet B. с соавт.[8]. Аффинность МКА вычисляли по методике Beatty J.D. [6].

Электрофоретический анализ антигенных препаратов проводили на приборе «Mini-PROTEAN 3» производства «Bio-Rad Laboratories, inc.». В качестве стандартов молекулярных масс использовали наборы маркерных белков (ООО «Хеликон», Москва).

Рабочее разведение и отбор МКА для проведения иммуноблоттинга производили с помощью прямого варианта dot-иммуноанализа с экспериментальными ИПК по стандартной методике (Bode L., 1984). Иммуноблоттинг проводили в ячейке прибора «Mini-Trans-Blot» фирмы «Bio-Rad Laboratories, inc.» (США). Электрофореграммы и иммунограммы сканировали в приборе «Epson expression™ 10000 XL» («Epson»), изображения анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab TL120»® («TotalLab Ltd.»).

Иммунпероксидазные конъюгаты (ИПК) получали по методу Nakane P.K., Kawaoi A. [7]. Рабочее разведение каждого из них определяли, используя методику шахматного титрования. Биотинилирование моноклональных иммуноглобулинов осуществляли при помощи биотин-N-гидросукцинимидного эфира (Sigma, США).

Статистическую обработку результатов опытов проводили с помощью методов вариационной статистики, а также компьютерной программы «Statistica 6.0».

### Результаты исследования и их обсуждение

Коллекция гибридных клонов, продуцирующих МКА против антигена 200 kDa *B. pseudomallei*, была последовательно выведена из криоконсервированного состояния и сразу после размораживания оценена по показателям жизнеспособности. Показатели свидетельствовали о хорошем состоянии гибридом-продуцентов МКА. Для быстрого и эффективного восстановления функции антителопродукции гибридомы подвергали реклонированию.

Культивирование гибридных клеток *in vitro* осуществляли в ростовой среде с добавлением следующих компонентов: ЭТС, глутамин, пируват, антибиотики и витамины. На всех этапах культивирования оценивали интенсивность антителопродукции в ТИФМ. Гибридомы, накопленные *in vitro*, использовали для последующего введения мышам (накопление МКА *in vivo*).

Полученные после этапа накопления *in vivo* данные свидетельствовали о том, что каждая из гибридом обладает различной прививаемостью, антителопродукцией и способностью к образованию асцита.

Накопленные образцы МКА необходимо было проверить в качестве ингредиентов для сэндвич-варианта иммуноферментного анализа. Подбирали индивидуальные антитела или их смеси, выполняющие роль антител первого порядка ( $\text{AT}_1$ ), которые, будучи адсорбированными на твердой фазе, обеспечат активный захват антигена-мишени, и антитела второго порядка ( $\text{AT}_2$ ) для приготовления ИПК. При выборе варианта МКА, необходимо учитывать не только высокую специфичность антитела, но и величину аффинности и индекс аддитивности, а также характеристики, указывающие на то, что МКА будет направлено против эпитопа, который представлен с высокой плотностью на искомом антигене.

Изотипирование МКА, из которых была сформирована рабочая панель, показало, что девять из них принадлежат к классу IgM ( $3\text{C}_6$ ,  $4\text{A}_{10}$ ,  $5\text{C}_2$ ,  $5\text{C}_9$ ,  $5\text{H}_{11}$ ,  $6\text{A}_{11}$ ,  $6\text{B}_7$ ,  $6\text{E}_7$ ,  $7\text{A}_8$ ) и один – к IgA ( $6\text{F}_9$ ).

Постановка ТИФМ с различными вариантами МКА и контрольным антигеном (формаимидный экстракт *B. pseudomallei* 100) позволила определить варианты, наиболее активно взаимодействующие с этим антигеном. Было установлено, что более высокой активностью обладали образцы антител, выделенные из АЖ мышей, в отличие от антител, полученных из среды культивирования гибридом. В дальнейшем это и определило выбор образцов иммуноглобулинов, изолированных из АЖ мышей, в качестве ингредиентов для создания тест-системы.

Непрямой метод флуоресцирующих антител (НМФА) продемонстрировал доказательство поверхностной локализации эпитопов, узнаваемых МКА на микробной клетке *B. pseudomallei* 100. Также с помощью этого метода были получены различные данные об удельной активности МКА.

Видовая принадлежность всех образцов МКА и их гомогенность были подтверждены с помощью реакции иммунодиффузии в геле (РИД) с использованием антивидовой кроличьей сыворотки.

Дальнейшая работа была посвящена изучению эпитопной плотности и эпитопной направленности полученных МКА в иммуноблоттинге с образцами антигенов *B. pseudomallei* 100. Результаты свидетельствовали о том, что эпитопы, гомологичные МКА 5C<sub>2</sub> были обнаружены в составе фракций антигена с м.м. 37, 36, 35, 34, 30, 26, 24, 21, 18,4, т.е. эпитопная плотность узнаваемых данным МКА участков велика (табл. 1).

В качестве антител первого порядка использовали как индивидуальные образцы МКА, так и их смеси (от 3 до 5 вариантов МКА), которые имитировали поликлональный эффект за счет применения иммуноглобулинов различной эпитопной направленности. Оптимальный состав смеси первого порядка выбирали, ориентируясь на данные о конкурентных взаимоотношениях пар антител и о величинах их аффинности.

Для определения аддитивности каждого конкретного из десяти МКА, а также выяснения характера взаимоотношений пар МКА с антигеном 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* 100 использовали конкурентный ТИФМ. В данном методе учет результатов идет по относительному показателю, выраженному в процентах. Эта условная величина позволяет определить, на каком расстоянии эти эпитопы располагаются. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1

Эпитопная направленность МКА к антигенам *B. pseudomallei*

Наименование МКА	Выявленные эпитопы на биополимерах с м.м. (kDa) в составе:	
	ВСЭ	ФЭ
5C <sub>2</sub>	37, 36, 35, 34, 30, 26, 24, 21, 18,4	37, 33, 22, 18,6
4A10	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
6F9	37, 36, 35, 34, 26, 18,4	33, 22, 18,6
6A11	37, 36, 35, 34, 26, 21	33, 22, 18,6
6B7	37, 36, 35, 34, 26, 21	37, 33, 22, 18,6
6B7	52, 35, 34, 30	-
6E7	37, 36, 35, 34, 26	33, 22, 18,6
7A8	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6

Таблица 2

Индексы аддитивности для МКА 2A<sub>6</sub>, 3C<sub>6</sub>, 5C<sub>2</sub>

*	2A <sub>6</sub>	3C <sub>6</sub>	5C <sub>2</sub>
2A <sub>6</sub>	*	72	100
3C <sub>6</sub>		*	100
5C <sub>2</sub>			*

По результатам этой реакции был выбран оптимальный вариант смеси МКА различной эпитопной направленности, которые не конкурировали за взаимодействие с одним и тем же сайтом связывания на антигене. Наиболее успешной композицией была признана смесь МКА  $3C_6+5C_2+2A_6$ . Результаты определения индексов аддитивности этих пар МКА (>30%) свидетельствуют о том, что эпитопы, гомологичные каждому из антител, расположены на значительном расстоянии друг от друга.

Аффинность количественно измеряли с помощью непрямого варианта ТИФМ по методике по Beatty J.D. [6]. Для этого производили двукратное титрование образцов МКА в лунках планшета с контрольной серией антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100 (серия 23) и строили графики зависимости величины оптической плотности от логарифма разведения и вычисляли разведение МКА, которое соответствовало двукратному уменьшению количества связавшихся с носителем антител. Полученные величины констант аффинности ( $K_{aff}$ ) варьировали от  $9 \cdot 10^5$  до  $2 \cdot 10^8$   $M^{-1}$ , что свидетельствовало о различной прочности связывания МКА с гомологичными им участками контрольного АГ.  $K_{aff}$  МКА  $3C_6$ ,  $5C_2$ ,  $2A_6$  были равны  $9 \cdot 10^5$   $M^{-1}$ ,  $2 \cdot 10^8$   $M^{-1}$  и  $8 \cdot 10^7$   $M^{-1}$  соответственно.

Установлено, что нагрузка твердой фазы МКА в концентрации 10 и 20 мкг/мл обеспечивала одинаковую чувствительность тест-системы, а повышение до 50 мкг/мл

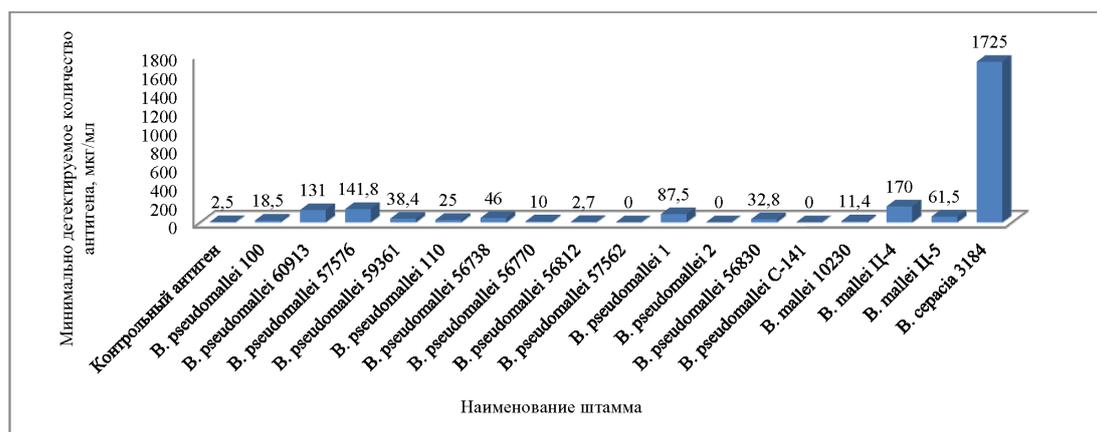
существенно снижало чувствительность тест-системы.

Для приготовления АТ второго порядка, основы для ИПК, были использованы восемь вариантов МКА, из них семь ( $3C_6$ ,  $4A_{10}$ ,  $5C_2$ ,  $6A_{11}$ ,  $6E_7$ ,  $6F_9$ ,  $7A_8$ ) подошли по параметрам качества иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) были проверены методом шахматного титрования в ТИФМ. ИПК на основе  $2A_6$  и  $5C_2$  достигали наибольшей чувствительности тест-системы.

После завершения этапов оптимизации условий подготовки твердой фазы и получения иммунопероксидазных конъюгатов и их характеристики, была подобрана наиболее эффективная композиция ингредиентов тест-системы: АТ<sub>1</sub> ( $3C_6+5C_2+2A_6$ ) в концентрации 20 мкг/мл на твердой фазе + антиген + АТ<sub>2</sub> (ИПК  $5C_2$  в рабочем разведении).

Разработанная экспериментальная тест-система была изучена по параметрам чувствительности и специфичности. Все этапы «сэндвич» – варианта твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ) проводили согласно общепринятым рекомендациям [1].

Установлено, что чувствительность тест-системы в реакции со стандартным антигеном составляла 2,5 мкг/мл. Обнаружение АГ 200 kDa в водно-солевых экстрактах (ВСЭ) капсулообразующих буркхольдерий II-III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) подтвердило ее пригодность для оценки содержания этого антигена в них (рисунок).



Чувствительность обнаружения антигена 200 kDa в ВСЭ патогенных буркхольдерий в ТИФМ, мкг/мл

Следует отметить, что чувствительность выявления антигена 200 *kDa* возбудителя мелиоидоза в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов была значительно ниже, чем при выявлении его в пробах, приготовленных из микробных клеток штаммов гомологичного вида.

Данные, представленные на рисунке, позволяют сделать вывод о том, что экспериментальная тест-система пригодна для анализа водно-солевых экстрактов антигенов с точки зрения содержания антигена 200 *kDa*.

### Выводы

В результате проделанной работы было установлено, что каждый вариант МКА из панели иммуноглобулинов к гликопротеину 200 *kDa* возбудителя мелиоидоза обладает индивидуальными характеристиками, которые свидетельствуют о различной эпитопной направленности этих антител и их высокой специфической активности. Оптимизация условий конструирования тест-системы позволила определить состав смеси МКА ( $3C_6 + 5C_2 + 2A_6$ ), сорбируемой на твердой фазе, и подобрать высокоактивное детектирующее антитело ( $5C_2$ ), которое в составе ИПК обеспечило тест-системе высокую чувствительность выявления антигена 200 *kDa*, равную 2,5 мкг/мл.

### Список литературы

1. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
2. Фрешни, Р. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Фрешни. – 5-е изд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 714 с.
3. Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Корсакова И.И. и др. Перспективы создания диагностических средств индикации и идентификации вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза // Матер. науч.-практич. конф. «Соврем. аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на юге России» (21–22.03.07). – Ставрополь, 2007. – Ч. 2. – С.155–6.
4. Эпидемиологическая обстановка в Российской Федерации и основные направления деятельности по ее стабилизации: Материалы к докладу Г.Г. Онищенко – Главного государственного санитарного врача Российской Федерации на 8-ом Всероссийском съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва 26–28 марта 2002 г. – М.: Минздрав РФ, 2002.
5. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* // Acta trop. – 2000. № 74. – P.221–228.
6. Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // J Immunol Methods. – 1987. Vol.100: 173–179.
7. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. – 1974. V. 22, № 12. – P. 1084 – 1091.
8. Friguet B., Djavadi-Ohanian L., Pages J. et al. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site // J. Immunol. Methods. – 1983. V. 60: 351–358.