

Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы

А.С. Туманов, К.А. Воробьев, Д.В. Печенкин, Г.Д. Елагин, Г.В. Куклина,
А.В. Еремкин, А.А. Кытманов, Н.В. Богачева, С.А. Шурупов, С.С. Ипатов

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны
Российской Федерации, 610000, Российская Федерация, г. Киров,
Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 15.12.2016 г. Принята к публикации 05.04.2017 г.

Идентификация возбудителей опасных инфекционных заболеваний – одна из основных задач биологической защиты войск и населения Российской Федерации. Цель настоящей работы – разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы. Для достижения поставленной цели были получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенным детерминантам возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы; подобраны пары моноклональных антител, применение которых в составе сенситива и иммунопероксидазного конъюгата обеспечивает максимальную чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. С использованием моноклональных антител изготовлены иммуноферментные моноклональные тест-системы, предназначенные для выявления возбудителей туляремии и сапа с чувствительностью $(2,5-5,0) \times 10^5$ м.к./мл, возбудителя сибирской язвы – $(1,25-2,5) \times 10^5$ спор/мл, возбудителя мелиоидоза – $(1,25-5,0) \times 10^5$ м.к./мл. Тест-системы могут быть использованы для идентификации возбудителей опасных инфекционных заболеваний в микробных культурах, материалах, полученных от больных или погибших людей и животных, а также в пробах из объектов окружающей среды.

Ключевые слова: туляремия; сап; мелиоидоз; сибирская язва; моноклональные антитела; твердофазный иммуноферментный анализ.

Библиографическое описание: Туманов А.С., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Куклина Г.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Богачева Н.В., Шурупов С.А., Ипатов С.С. Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 2. С. 21–27.

На территории Российской Федерации установлены природные очаги опасных инфекционных болезней, кроме того, существует риск заноса возбудителей опасных болезней с сопредельных территорий. В связи с этим своевременная идентификация воз-

будителей особо опасных и опасных инфекционных заболеваний в объектах окружающей среды и установление природы инфекционных болезней у людей представляет собой одну из важных задач биологической защиты войск и населения Российской Федера-

ции. Решение данной задачи непосредственно зависит от наличия соответствующих доступных и эффективных методов и наборов реагентов для выявления патогенных бактерий [1, 2]. Иммуноферментный анализ (ELISA – англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ИФА) – надежный, селективный и чувствительный метод выявления антигенных детерминант у микроорганизмов. Активное развитие в настоящее время методов мультиплексного иммуноанализа не смогло вытеснить ИФА из практики лабораторной диагностики инфекционных болезней и он по-прежнему остается «золотым стандартом» иммунохимических методов исследования [3]. Основным направлением совершенствования иммунохимических методов анализа в настоящее время является использование в качестве специфических компонентов моноклональных антител (МкАт) как продукта гибридомной технологии [4]. В Российской Федерации перечень зарегистрированных как изделия медицинского назначения для диагностики *in vitro* и выпускаемых иммуноферментных наборов реагентов на основе МкАт ограничен [5].

Цель настоящей работы – разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы.

Для достижения поставленной цели нами были получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенным детерминантам возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы; подобраны пары моноклональных антител, применение которых в составе сенситина и иммунопероксидазного конъюгата обеспечивает максимальную чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

При получении гибридом-продуцентов МкАт в качестве видоспецифических антигенов для возбудителей туляремии, сапа и мелиоидоза выбран липополисахаридный антиген, для возбудителя сибирской язвы – споровый антиген сибиреязвенного микроба, полученные в филиале ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров).

Процедуру слияния В-лимфоцитов селезенки иммунных мышей и клеток миеломы проводили химическим методом с использованием полиэтиленгликоля по методике G. Kohler и C. Milstein [6].

Иммуноглобулины из асцитных жидкостей выделяли методом двукратного высаливания насыщенным раствором сульфата аммония (степень насыщения – 40 %) с последующим диализом против 0,15 М натрия хлорида с добавлением 20 мМ фосфатного буферного раствора, pH 7,5±0,1. Образовавшийся после диализа осадок удаляли центрифугированием. Раствор иммуноглобулинов фильтровали через шприцевую фильтрующую насадку («Merck Millipore», Германия) с диаметром пор 0,22 мкм. Окончательную очистку иммуноглобулинов осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-сефацелом («Sigma-Aldrich», США) [7].

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich», США) осуществляли по методу P.K. Nakane и A.J. Kawaoi [8]. Рабочее разведение конъюгатов определяли методом «шахматного титрования» [9].

Для лиофилизации иммуноферментного конъюгата использовали защитную среду следующего состава: 5 % сахарозы, 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина в 0,5 М ТРИС-HCl, pH 7,4±0,1; в качестве среды высушивания для иммуноглобулинов применяли 5 % раствор сахарозы в 0,5 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,6±0,1.

Лиофилизацию проводили в установке для лиофилизации АЛСУ (ООО ОКБ «Фармбиомаш», Россия). Ампулы запаивали и помещали на хранение при температуре 4 °С. После этапа лиофильного высушивания были отобраны образцы из готовленных серий тест-систем и проведено их лабораторно-экспериментальное изучение.

Приготовление микробных взвесей с заданной концентрацией проводили визуально с помощью стандартных образцов мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-85П).

Воспроизводимость результатов ИФА оценивали путем определения относительного значения вариации оптической плотности субстратно-индикаторной смеси. Расчет коэффициента вариации проводили по результатам изучения положительных и отрицательных контрольных

Таблица 1 — Характеристики МкАт к антигенам возбудителя туляремии, сапа, мелиоидоза, сибирской язвы

Возбудитель	Характеристики МкАт		
	Наименование гибридом	Титр МкАт в асцитной жидкости (медиана титров)	Субкласс иммуноглобулинов
туляремии	31G1F10	1:160000	G ₁
	31E3B9	1:160000	
	36D5F4	1:2560000	
	32E5D3	1:160000	M
	35B11C8	1:2560000	
	36C2F11	1:960000	
сапа	258F12G11	1:160000	G ₃
	292G4D4	1:640000	G ₁
	298C11E11	1:640000	
	301E5 F1	1:320000	
melioidosis	253B4D4	1:160000	G ₁
	286C7B10	1:160000	
	296F8D5	1:320000	
	297C7B11	1:960000	
	297H9D8	1:2560000	G _{2a}
сибирской язвы	272F7A10	1:160000	G ₁
	272E10G1	1:2560000	
	280A4H6	1:160000	
	278H4A7	1:960000	G _{2a}

проб для 3 образцов каждой серии четырех наименований тест-систем.

Результаты и обсуждение

Разработка иммуноферментных моноклональных тест-систем, предназначенных для выявления возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы, была проведена в несколько этапов.

На первом этапе осуществляли получение гибридом-продуцентов МкАт к антигенным детерминантам возбудителей опасных инфекционных заболеваний.

По результатам проведенных гибридизаций, иммунологического скрининга гибридных культур, оценки специфической активности и специфичности МкАт, клонирования и пассажей гибридных клеточных линий на мышах линии BALB/c было получено: к липополисахаридным антигенам возбудителей туляремии, сапа и мелиоидоза – 6, 4 и 5 гибридных клеточных линий соответственно, к споровому антигену сибиреязвенного микроба – 4 гибридных клеточных линии, продуцирующих МкАт. Эффективность гибридизации

(количество лунок с продуцирующими иммуноглобулины колониями от общего количества лунок с колониями) составила от 2,9 до 7,8 %. Все позитивные гибридные клеточные линии были паспортизованы и криоконсервированы.

Характеристики МкАт к антигенам возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза, сибирской язвы представлены в таблице 1.

Следующим этапом работы стал подбор пар МкАт (таблица 2), обеспечивающих максимальный уровень чувствительности в иммуноферментном анализе и перспективных для создания на их основе специфических компонентов иммуноферментных тест-систем.

Следует отметить, что при изучении комбинаций МкАт к антигенам возбудителя сапа оптимальную чувствительность обеспечили антитела гибридной клеточной линии 289F12H11 при использовании их как в составе сенситина, так и в составе иммунопероксидазного конъюгата.

На заключительном этапе исследования были изготовлены по три серии экспериментальных образцов иммунофер-

Таблица 2 — Результаты подбора пар МкАт, обеспечивающих максимальную чувствительность иммуноферментного анализа, в зависимости от штамма возбудителя

Тест-система для выявления возбудителя	Наименование МкАт в составе		Чувствительность ИФА при выявлении положительных контрольных образцов, м.к. (спор)/мл
	сенситина	конъюгата	
туляремии	31E3B9	35B11C8	$(2,5-5,0) \times 10^5$
сапа	289F12H11	289F12H11	$(2,5-5,0) \times 10^5$
melioidоза	255B6E1	255A6F5	$(1,25-5,0) \times 10^5$
сибирской язвы	278H4A7	272F7A10	$(1,25-2,5) \times 10^5$

ментных моноклональных тест-систем для каждого наименования возбудителя и проведена оценка их индикаторных свойств.

Установлено, что иммуноферментная моноклональная тест-система для выявления возбудителя туляремии обеспечивала выявление *Francisella tularensis* штаммов 503, 543, Schu, 15 НИИЭГ в концентрации от 5×10^5 м.к./мл и не давала ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов бактериальной природы родов *Yersinia*, *Burkholderia*, *Brucella*, *Legionella*, *Bacillus*, *Vibrio* в концентрации 1×10^8 м.к./мл.

Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления возбудителя сапа обеспечивала выявление *Burkholderia mallei* штаммов Ц-5, 10230, 11 в концентрации от $2,5 \times 10^5$ м.к./мл. Тест-система для выявления возбудителя мелиоидоза обеспечивала выявление *Burkholderia pseudomallei* штаммов Dalat, Duc-V, C-141 в концентрации от $1,25 \times 10^5$ до $5,0 \times 10^5$ м.к./мл в зависимости от штамма микроорганизма. Обе тест-системы были специфичны в отношении гетерологичных бактерий родов *Yersinia*, *Francisella*, *Brucella*, *Legionella*, *Bacillus*, *Vibrio*, взятых в концентрации 1×10^8 м.к./мл. Необходимо отметить, что, несмотря на высокую степень гомологии антигенных детерминант рассматриваемых возбудителей, вышеуказанные тест-системы обеспечивали возможность дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации последних в пробе от 1×10^7 м.к./мл.

Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления возбудителя сибирской язвы обеспечивала выявление спорных антигенов *B. anthracis* штаммов

СТИ-1, Гиев, 55, Ихтиман, Sterne в концентрации от $1,25 \times 10^5$ спор/мл и была специфичной в отношении сапрофитных бактерий и гетерологичных микроорганизмов бактериальной природы родов *Yersinia*, *Burkholderia*, *Brucella*, *Legionella*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Francisella*, взятых в концентрации 1×10^8 спор (м.к.)/мл.

Общий вид тест-системы (на примере набора реагентов для выявления возбудителя туляремии) и ее компонентов представлен на рисунке 1.

Необходимо отметить, что алгоритм анализа проб и состав комплекта для всех разработанных тест-систем одинаков, что способствует снижению риска технических ошибок оператора, а также значительно сокращает общее время постановки анализа при поступлении большого количества проб.

Разработанные нами иммуноферментные тест-системы предназначены для обнаружения и идентификации возбудителей опасных инфекционных заболеваний в материалах, полученных от больных или погибших людей и животных, а также в пробах из объектов окружающей среды. Они серьезно расширяют набор диагностических средств, используемых в России для идентификации возбудителей опасных инфекционных болезней. На отечественном рынке до настоящего времени отсутствуют иммуноферментные средства детекции возбудителя сибирской язвы. Тест-система для выявления и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза (производства ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) рекомендована только для экспериментальных исследований. Имму-



Рисунок 1 — Тест-система иммуноферментная моноклональная для выявления возбудителя туляремии (общий вид и ее компоненты)

ноферментная тест-система для выявления возбудителя туляремии (производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) изготавливается с использованием поликлональных иммуноглобулинов и не может считаться высокоспецифичной. Разработанные нами тест-системы, в отличие от указанных выше, могут быть использованы как для оснащения мобильных комплексов анализа патогенных биологических агентов, так и при осуществлении специфической индикации патогенов в стационарных лабораториях специализированных служб.

Выводы

1. Получены панели гибридом-продуцентов МкАт к видоспецифическим антигенным детерминантам возбудителей туляремии, сапа, мелиоидоза и сибирской язвы.

2. С использованием МкАт изготовлены иммуноферментные моноклональные тест-системы, предназначенные для выявления в материалах, полученных от больных или погибших людей и животных, а также в пробах из объектов окружающей среды возбудителей туляремии и сапа с чувствительностью $(2,5-5,0) \times 10^5$ м.к./мл, возбудителя сибирской язвы – $(1,25-2,5) \times 10^5$ спор/мл, возбудителя мелиоидоза – $(1,25-5,0) \times 10^5$ м.к./мл.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла двойное слепое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИНТЕРСЕН, 2002. 384 с.
2. Evans R.G., Crutcher J.M., Shadel B., et al.

Terrorism from a public health perspective // Am. J. Med. Sci. 2002. V. 323, № 6. P. 291-298.

3. Принципы и методы биохимии и молеку-

лярной биологии / Под ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер; пер. с англ. 2-е изд., перераб. и доп. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 848 с.

4. Wang D.B., Yang R., Zhang Z.P. et al. Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2009 Nov 13;4(11):e7810.

5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Онищенко Г.Г., Кутырева В.В. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина, Шико, 2013. 472 с.

6. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. 1975. V. 256, № 5517. P. 495–497.

7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.

8. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. V. 22, № 12. P. 1084–1091.

9. Фримель Г. Иммунологические методы: пер. с англ. М.: Медицина, 1987. С. 89–97.

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Туманов Александр Сергеевич. Начальник филиала, канд. биол. наук.

Воробьев Константин Анатольевич. Начальник отдела планирования НИР – заместитель начальника филиала по НИР, д-р биол. наук.

Печенкин Денис Валериевич. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Елагин Георгий Дмитриевич. Ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Куклина Галина Викторовна. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Еремкин Андрей Валентинович. Заместитель начальника отдела – начальник группы научно-исследовательского отдела.

Кытманов Алексей Александрович. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Богачева Наталья Викторовна. Начальник группы научно-исследовательского отдела, д-р мед. наук, доцент.

Шурупов Сергей Анатольевич. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Ипатов Сергей Сергеевич. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Адрес для переписки: Печенкин Денис Валериевич; denispechenkin@mail.ru

The Development of Immunoenzyme Monoclonal Test Systems for Detection of Tularemia, Glanders, Melioidosis and Anthrax Agents

A.S. Tumanov, K.A. Vorobyov, D.V. Pechenkin, G.D. Elagin, G.V. Kuklina, A.V. Eremkin,
A.A. Kytmanov, N.V. Bogacheva, S.A. Shurupov, S.S. Ipatov

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

The identification of causative agents of dangerous infectious diseases of bacterial origin is one of the main tasks of the biological protection of troops and the civilian population of the Russian Federation. This article is dedicated to the problem of the development of immunoenzyme monoclonal test system for detection of tularemia, glanders, melioidosis and anthrax agents. In order to achieve the above-mentioned goal, the hybridomas-producers of monoclonal antibodies

to antigenic determinants of pathogens of tularemia, glanders, melioidosis and anthrax have been prepared. The pairs of monoclonal antibodies, the application of which in the composition of sensitin and immunoperoxidase conjugate provide maximum sensitivity and specificity of enzyme immunoassay test, have been selected and the immunoenzyme monoclonal test systems for detection of tularemia, glanders, melioidosis and anthrax agents have been developed based on the above mentioned monoclonal antibodies. These developed test-systems can help to identify the pathogens of dangerous infectious diseases in microbial cultures, in probes taken from sick and dead people and animals and from environmental probes.

Key words: tularemia; glanders; melioidosis; anthrax; monoclonal antibodies; ELISA.

For citation: Tumanov A.S., Vorobyov K.A., Pechenkin D.V., Elagin G.D., Kuklina G.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Shurupov S.A., Ipatov S.S. The Development of Immunoenzyme Monoclonal Test Systems for Detection of Tularemia, Glanders, Melioidosis and Anthrax Agents // *Journal of NBC Protection Corps*. 2017. V. 1. № 2. P. 21–27.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Cherkassky B.L. Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax. Moscow: INTERSEN, 2002. 384 p. (in Russian).
2. Evans R.G., Crutcher J.M., Shadel B., et al. Terrorism from a public health perspective // *Am. J. Med. Sci.* 2002. V. 323, № 6. P. 291–298.
3. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology / Ed. Wilson K., Walker J. Transl. from Eng. Second ed., revised and supplemented. Moscow: BINOM. Knowledge Lab, 2015. 848 p. (in Russian).
4. Wang D.B., Yang R., Zhang Z.P. et al. Detection of B. anthracis spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies. *PLoS One*. 2009 Nov 13;4(11):e7810.
5. Laboratory diagnostics of especially dangerous infections. Practical guide. Eds. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V. et al. Second ed., revised and supplemented. Moscow: Medizina, Shiko. 2013. 472 p. (in Russian).
6. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. 1975. V. 256, № 5517. P. 495–497.
7. Doson R., Elliot D., Elliot W., Johns K. Handbook of Biochemistry. Moscow: MIR, 1991. 544 p. (in Russian).
8. Nakane P.K., Kawaoi A.J. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. V. 22, № 12. P. 1084–1091.
9. Frimel G. Immunological Methods. Transl. from Eng. Moscow: Medizina, 1987. P. 89–97 (in Russian).

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

Tumanov A.S. Chief of the Branch. Candidate of Medical Sciences, Associate Professor.

Vorobyov K.A. Chief of the Department of Planning of Science and Research – Deputy Chief of the Branch. Doctor of Biological Sciences.

Pechenkin D.V. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Elagin G.D. Leading Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Kuklina G.V. Junior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Eremkin A.V. Deputy Head of the Department – Chief of the Group of the Scientific and Research Department.

Kytmanov A.A. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Bogacheva N.V. Chief of the Group of the Scientific and Research Department. Doctor of Medical Sciences, Associate Professor

Shurupov S.A. Researcher of the Scientific and Research Department.

Ipatov S.S. Junior Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Address: Pechenkin Denis Valeryevich; denispechenkin@mail.ru