

специфическое мембранотропное действие, сопровождающееся повышением проницаемости клеточных и лизосомальных мембран, приводящее к изменению их физико-химических характеристик [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментальный панкреонекроз сопровождается окислительным стрессом, что приводит к угнетению ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты.

2. Печень рано подвергается воздействию окислительного стресса и обладает выраженными компенсаторными резервами как основной продуцент антиоксидантов.

3. С целью коррекции окислительного стресса патогенетически обосновано применение антиоксидантов гепатотропного действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буянов В.М., Ступин И.В., Егеев В.Н. и др. // Клинич. хирургия. – 1989. – № 11. – С. 24–26.
2. Власов А.П., Герасименко А.В., Тарасова Т.В. и др. // Материалы IX конференции хирургов-гепатологов России и стран СНГ. – СПб., 2002. – С. 193–194.
3. Демин Д.Б., Тарасенко В.С., Волков Д.В. и др. // Вестн. хирургии. – 2003. – № 5. – С. 47–50.

4. Костюченко А.Л., Филин В.И. Неотложная панкреатология. – СПб.: Деан, 2000. – 480 с.

5. Луцевич Э.В., Чепеленко Г.В. // Хирургия. – 2001. – № 9. – С. 57–60.

6. Морозов С.В. Прогнозирование и профилактика послеоперационного панкреатита: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Омск, 1999. – 151 с.

7. Назыров Ф.Г., Ваккасов М.Х., Акилов Х.А. и др. // Анн. хир. гепатол. – 2001. – № 2. – С. 131–135.

8. Нестеренко Ю.А., Лаптев В.В., Михайлулов С.В. и др. // Рос. мед. журн. – 2002. – №1. – С. 34–39.

9. Прокопьева Н.В. Исследование системы метаболизма ксенобиотиков в печени при остром панкреатите: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 2000. – 27 с.

10. Толкач А.Б., Долгих В.Т., Рейс Б.А. и др. // Анест. и реаним. – 2001. – № 2. – С. 51–55.

11. Тупикова З.Н. // Вопр. мед. химии. – 1983. – № 3. – С. 108–111.

12. Шанин Ю.Н., Шанин В.Ю., Зиновьев Е.В. Антиоксидантная терапия в клинической практике. – СПб: ЭЛБИ-СПб, 2003. – 122 с.

13. Чудных С.М., Титова Г.П., Турчина Е.П., и др. // IX Всерос. съезд хирургов. – Волгоград, 2000. – С. 127–128.

14. Dabrowski A., Gabryelewicz A. // Scand. J. Gastroenterol. – 1994. – Vol. 29, № 10. – P. 943–948.

15. Floid A., Pedersen L., Nielsen G.L., et al. // Scand. J. Gastroenterol. – 2002. – Vol. 12, № 37. – P. 1461–1465.

УДК 576.851.9:616.981.718

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ *COXIELLA BURNETII*: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛИХОРАДКИ КУ

Е.В. Прохвятилова, Н.П. Храпова, В.Н. Лебедев*, С.Н. Ионов*, В.А. Харченко*, И.А. Чуркин*,
Н.Г. Плеханова, С.Н. Тихонов, Г.В. Шумакевич**, Н.А. Ерасова, Л.И. Белицкая
Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,
Вирусологический центр НИИМ МО России, г. Сергиев-Посад, Московская обл.*
ФГУЗ Центр эпидемиологии и гигиены по Волгоградской обл.**

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ANTIGENS OF *COXIELLA BURNETII*: DEVELOPMENT, CHARACTERISTICS AND PERSPECTIVES OF APPLICATION IN LABORATORY DIAGNOSTICS OF QU FEVER

E.V. Prokhvatilova, N.P. Khrapova, V.N. Lebedev, S.N. Ionov, V.A. Kharchenko, I.A. Tchourkin,
N.G. Plekhanova, S.N. Tikhonov, G.V. Shumakevich, N.A. Erasova, L.I. Belitskaya

Abstract. The collection of hybridomas (7 types) producing monoclonal antibodies (MA) by fusion of cells of mice myeloma of line P3-X63-Ag.653 and splenocytes of BAL/c mice, immunized with antigens of I-II phase of *C.burnetii* has been developed. MA are directed at different epitomes, located on the antigen complexes of *Coxiella burnetii*. The characteristics of MA (specifity, activity) have been studied using ELISA and FIA; perspectives of their application for the laboratory diagnostics of QU fever are discussed.

Key words: monoclonal antibodies, *coxiella burnetii*, laboratory diagnostics.

Неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по коксиеллезу, сложившаяся за последнее десятилетие в России, характеризуется расширением очагов инфекции и подъемом заболеваемости людей лихорадкой Ку. Важнейшим на-

правлением повышения эффективности эпиднадзора за коксиеллезом остается разработка новых подходов к конструированию диагностических препаратов быстрого и достоверного обнаружения коксиелл Бернета в различных объектах

исследования [2, 3, 5].

Средства индикации на основе моноклональных антител (МКА) отвечают этим требованиям, благодаря не только их уникальной специфичности в отношении антигенных детерминант микроорганизмов, но и высокой активности и стандартности моноклональных препаратов [7, 8, 9, 11].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Получить гибридные клеточные линии, продуцирующие моноклональные антитела к различным диагностически значимым антигенным детерминантам *C.burnetii*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Воспроизведение методических приемов гибридомной технологии на модели *C.burnetii* потребовало проведения 8 опытов по гибридизации клеточных линий [1]. Опухолевым партнером служили линии мышинной миеломы: РЗ-Х63-Ag.653, Sp2/0, конъюгирующим агентом – 50 %-й раствор PEG 4000 ("Serva"). Иммунизацию мышей проводили различными антигенными препаратами: коммерческим антигеном II фазы *C.burnetii* для реакции связывания комплемента (РСК) (производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва), антигеном I и II фаз, очищенным от примесей среды культивирования РКЭ методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, урографина (производства Вирусологического центра НИИ микробиологии МО, г. Сергиев-Посад). Суммарная доза антигенной нагрузки составила 265–300 мкг/ на мышь на цикл иммунизации с бустерной инъекцией микродоз антигена внутриселезеночно.

Концентрированный очищенный препарат антигена I фазы коксиселл Бернета получали при инфицировании развивающегося куриного эмбриона (РКЭ) штаммом Грита, антигена коксиселл Бернета II фазы – штаммом М-44. Затем гомогенат инфицированных РКЭ (концентрация коксиселл $\approx 1 \cdot 10^7$ ИД₅₀.см⁻³) разводили фосфатным буферным раствором (БФР) в отношении 1:10 и инактивировали формалином (по ФС 42-344ИС-90). Клеточную суспензию обрабатывали методом дифференциального центрифугирования с применением эфирной экстракции по Креджи. Очистку коксиселл от примесей среды культивирования проводили путем осаждения полученного препарата через слой 40 %-го раствора сахарозы [10].

Схема иммунизации инбредных мышей включала в себя 3–4 инъекции, при этом варьировали дозы, способы введения антигена и интервалы между инъекциями и бустером (0-7-14-21-28). В твердофазном иммуноферментном методе (ТИФМ) титры специфических антител в сыворотках крови экспериментальных животных составили 1:4000–1:8000. Проведение опытов по гибридизации клеток и получению МКА осуществляли в соответствии со стандартным протоколом [1].

Скрининг коксиселлезных МКА, продуцируемых гибридами, проводили с помощью ТИФМ

в непрямом варианте с применением антивидового конъюгата в соответствии с рекомендованной методикой [9]. Для сенсibilизации пластин использовали антигенный препарат фазы II *C.burnetii* М-44 (АГ фазы II). Выполняя весь опыт с антиген (АГ) фазы II *C.burnetii*, в ограниченном числе случаев использовали препараты АГ фазы I *C.burnetii*, в которых этот антиген расположен поверхностно.

При оценке специфичности продуцируемых гибридами МКА в качестве гетерологичных контролей использовали антигенные препараты *R.prowazekii* 288, *R.typhi*.

Учитывая тот факт, что антигенный препарат содержал в большом количестве примеси антигенов желточных оболочек куриных эмбрионов, в качестве отрицательного контроля в ТИФМ использовали пластины, сенсibilизированные антигенными препаратами среды культивирования (интактных РКЭ).

Способность гибридом индуцировать выработку асцитической жидкости в организме мышей BALB/c изучали путем внутрибрюшинной инокуляции (1,0–1,5) · 10⁶ гибридных клеток животным, предварительно праймированным за 5–7 дней 0,5 мл пристана (Pristan, Sigma).

Иммуноглобулины выделяли из культуральных супернатантов и асцитов мышей методом осаждения сульфатом аммония (50 % насыщения) одно- или трехкратно соответственно. Определение классов и субклассов иммуноглобулинов, продуцируемых гибридами, проводили с помощью иммуноферментного изотипирующего набора фирмы "Serva" в соответствии с методическими рекомендациями.

Для подтверждения направленности полученных МКА к эпитопам I и II фаз *C.burnetii* антитела тестировали в непрямом варианте ТИФМ с коммерческим антивидовым конъюгатом (производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). При постановке реакции были использованы: антигенные препараты I и II фаз *C.burnetii* М-44, Грита и *R.prowazekii*, *R.typhi*, полученные сотрудниками ВолГНИПЧИ и ВЦ НИИМ МО России.

В МФА использовали фиксированные мазки с корпускулярными антигенами *C.burnetii* II фазы, приготовленными из суспензий инфицированных РКЭ, для эффективной очистки от эмбриональных белков и липидов применяли методику дифференциального центрифугирования (урографин, перколл, сахарозу). Корпускулярные антигены *C.burnetii* I фазы, *R.prowazekii*, *R.typhi* для экспериментов были получены сотрудниками ВЦ НИИМ МО России по методу, описанному ранее [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанные методические приемы позволили достичь воспроизводимости опытов и достаточно высоких показателей эффективности гибридизации клеточных линий. К концу первого ме-

(17)

сяца культивирования показатель эффективности гибридизации колебался в пределах 50–65 %, а эффективность получения антителопродуцентов не превышала 20 % [4].

На первых этапах было отобрано 137 первичных клонов. После этапов клонирования клеточных культур, оценки стабильности признака антителопродукции, сохранения его в процессе культивирования клеток *in vitro* и криоконсервации, оценки свойств с помощью серологических методов была сформирована коллекция из 6 клонов-продуцентов моноклональных антител против разнообразных антигенных детерминант возбудителя лихорадки Ку.

В табл. 1 представлена характеристика МКА, клонированных гибридом, из которой следует, что они обладали различной специфичностью в отношении комплексов I и II фаз *C.burnetii*, и среди них преобладают иммуноглобулины класса М.

Результаты ТИФМ позволили условно выделить несколько групп гибридов-продуцентов МКА по их способности распознавать один единственный эпитоп на антигенных структурах *C.burnetii*. Так, гибридные клетки, условно объединенные в первую группу (2D1, 2D3, 1D9, 1B3), синтезировали антитела к антигенному комплексу фазы II *C.burnetii*, при этом не взаимодействовали с эпитопами фазы I *C.burnetii* и антигенами гетерологичных видов микроорганизмов. Однако активность антител МКА данной группы в ТИФМ была невысокой (показатели титра антител составляли от 1:50 до 1:640), что, по-видимому, обусловлено низкой плотностью гомологичных эпитопов, расположенных на молекуле биополимера *C.burnetii*. Наиболее высокие показатели активности были зарегистрированы с МКА 5E4 (показатели титра антител – 1:25800), принадлежащих к классу IgG. Но в этом случае МКА 5E4 взаимодействовали с эпитопами, общими для

R.prowazekii, *R.typhi*. В ТИФМ образцы МКА 1B11 специфически взаимодействовали с детерминантами, общими для I и II фаз *C.burnetii*, а МКА, полученные из коллекции ВЦ НИИМ МО России, были направлены к эпитомам I фазы *C.burnetii*, не давая перекрестных реакций с эпитопами II фазы *C.burnetii* и других родов риккетсий. При этом, по данным ТИФМ, показатели титра антител последней группы (B11, C3/S-3E5) составляли от 1:1280 до 1:25600.

Скрининг гибридом в ТИФМ свидетельствовал о том, что полученные МКА продемонстрировали разную специфическую активность в отношении эпитопов *C.burnetii*. Наиболее активные МКА 5E4 обладали способностью к кросс-реактивности с гетерологичными микроорганизмами семейства *Rickettsiaceae*. МКА 2D1, 2D3, 1D9, 1B11 несколько уступали по уровню антителопродукции 5E4, но обладали большей специфичностью. Можно предположить, что антигенные детерминанты, общие для коксиилл и других микроорганизмов семейства *Rickettsiaceae*, являются иммунодоминантными, в то время как строго специфичные антигенные детерминанты *C.burnetii* менее активны и обладают меньшим иммуногенным потенциалом в процессе иммунизации мышей-доноров.

На наш взгляд, полученные данные о свойствах антител свидетельствуют о возможности использования данной группы МКА (2D1, 2D3, 1D9, 1B3) в виде смеси специфических иммуноглобулинов (имитатора поликлональной иммунной сыворотки) в серологических тестах обнаружения коксиилл Бернета. Для окончательного вывода о целесообразности отбора МКА для этих целей, характера взаимоотношений МКА разной эпитопной направленности необходимо провести конкурентный ТИФМ с подсчетом индекса аддитивности во всех возможных комбинациях МКА.

Для оценки принципиальной возможности применения указанных МКА в качестве основы современных иммунобиологических препаратов были получены экспериментальные серии флуоресцирующих иммуноглобулинов. Наиболее перспективными для последующего использования являлись МКА 1B3, 2D1, 1D9. Специфические конъюгаты для метода флуоресцирующих антител (МФА) готовили на основе МКА в соответствии с рекомендациями J.W. Goding (1980). После проведения всех этапов конъюгирования с флуорохромом МКА сохраняли способность взаимодействовать с эпитопом, локализованным на поверхности клеток *C.burnetii*. В работе были использованы по 3 серии вышеперечисленных МКА.

При микроскопии мазков флуоресцирующие антитела 1B3, 2D1, 1B9 в рабочем разведении с достоверной точностью позволяли выявлять коксииллы Бернета, не давая перекрестных ре-

Таблица 1

**Специфическая активность
моноклональных антител в ТИФМ**

Название гибридов	Класс Ig	ТИФМ с антигенными препаратами			
		<i>C.burnetii</i> I фаза	<i>C.burnetii</i> II фаза	<i>R.prowazekii</i>	<i>R.typhi</i>
2D1	Ig M	–	+	–	–
2D3	Ig M	–	+	–	–
5E4	IgG ₂	–	+	+	+
1B11	Ig M	+	+	–	–
1D9	Ig M	–	+	–	–
1B3	Ig M	–	+	–	–
C3/S-3E5	IgG	+	–	–	–

Примечание. "+" – положительный результат, "–" – отрицательный результат в ТИФМ.

акций в предложенном методе с *R.prowazekii*, *R.typhi*. При изучении специфичности конъюгатов на основе МКА 5Е4 регистрировали окрашивание коксииелл Бернета на 3–4+ и близкородственных видов микроорганизмов (*R.prowazekii*) в МФА.

Для оценки пригодности применения препаратов для поиска коксииелл Бернета в объектах, полученных из инфицированного *C.burnetii* М-44 монослоя клеток, использовали линию L-929. Для МФА готовили “слайд-препараты” фиксированных на предметных стеклах мышинных фибробластов, инфицированных *C.burnetii* М-44. С помощью флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов специфический антиген выявляли в цитоплазме инфицированных клеток в виде характерного гранулярного свечения.

Возможность применения флуоресцирующих моноклональных конъюгатов исследовали

в экспериментах на инфицированных животных (морские свинки, мыши) после введения живой накожной вакцины против лихорадки Ку (табл. 2). Нами установлено, что в тканях печени и легких экспериментальных животных коксииеллы обнаруживаются в течении 5–7 сут., а в тканях селезенки – на протяжении всего периода исследований (21–24 сут.). Полученные нами результаты испытаний МФА с моноклональными конъюгатами свидетельствовали, с одной стороны, об эффективности использования препаратов для поиска возбудителя лихорадки Ку в пробах биологического материала, а с другой – о длительной персистенции коксииелл и патологических изменениях в органах лабораторных животных после применения живой вакцины против лихорадки Ку [6].

Таблица 2

Эффективность применения МФА с моно- и поликлональными коксииеллезными иммуноглобулинами при исследовании мазков-отпечатков из органов и тканей лабораторных животных, инфицированных *C.burnetii*

Шифр животного	Инфицирующий агент	Доза заражения	Сроки вскрытия	Специфическое свечение коксииелл в МФА*	
				моноклональное	поликлональное
1466 м. свинка	Вакцина лихорадки Ку М-44 живая накожная (1 амп. 10 ИД)	25 % – 0,5 мл	5	печень, селезенка	селезенка
1462 м. свинка	"	25 % – 0,5 мл	9	селезенка	селезенка
1463 м. свинка	"	25 % – 0,5 мл	15	селезенка	селезенка
1452 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	5	печень, селезенка	место введения
1453 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	5	селезенка	место введения
1454 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	9	селезенка	не обнаружено
1455 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	9	селезенка	селезенка
1457 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	15	легкие, селезенка	селезенка
1458 б. мышь	"	10 % – 0,5 мл	15	печень, селезенка	не обнаружено

* – исследованы мазки-отпечатки из места введения (перитонеальный смыв) – печени, селезенки, легких, мазок крови. В таблице перечислены те из них, в которых обнаружены *C.burnetii*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, после всестороннего изучения свойств гибридных клонов с помощью серологических методов будет определен ряд наиболее перспективных МКА для конструирования на их основе универсальных иммуноглобулиновых диагностикумов, позволяющих выявлять и идентифицировать коксииеллы Бернета в различных объектах исследования при проведении этапов лабораторного анализа на лихорадку Ку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к бактериальным антигенам. – М.: Центральный НИИВС им. И.И. Мечникова, 1985. – 37 с.
2. Методические рекомендации по эпидемиологическому надзору за Ку лихорадкой. – Омск, 1997. – 14 с.
3. Онищенко Г.Г. // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиология. – 1999. – № 4. – С. 14–18.

4. Прохватилова Е.В., Храпова Н.П., Смелянский В.П. и др. // Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье: сб. науч. трудов / Под ред. Н.Г. Тихонова. – Волгоград: Принт, 2000. – С. 203–209.

5. Тихонов Н.Г., Пашанина Т.П., Игнатович В.Ф. и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. – № 4. – С. 12–15.

6. Токарев Н.К., Просверницин С.А., Карцева Н.А. и др. // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиология. – 1994. – № 5. – С. 53–55.

7. Dackau T. // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. – 1999. – Bd. 106. – № 3. – S. 87–90.

8. Raoult D., Laurent J.C., Mutillod M. // Am. J. Clin. Pathol. – 1994. – Vol. 101, № 3. – P. 18–20.

9. Sekeyova Z., Kovacova E., Kazar J., et al. // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol. – 1995. – Vol. 2, № 5. – P. 531–534.

10. Williams J.C., Peacock M.G., McCaul T.F. // Infect. and Immun. – 1981. – № 5. – P. 840–851.

11. Yu X., Raoult D. // FEMES Microbiol. Lett. – 1994. – Vol. 117, № 1. – P. 15–19.