

ЗАМАРИНА ТАТЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
АНТИГЕНУ 200 КДА ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Храпова Наталья Петровна
доктор медицинских наук, профессор

Официальные
оппоненты:

Девдариани Зураб Леванович
доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник организационно-методического отдела с научной частью
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Алексеева Людмила Павловна
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией гибридом
ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт Роспотребнадзора

Ведущая организация:

ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится «___» апреля 2015 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208. 008. 06 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Волгоградском государственном медицинском университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» (400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1).

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор социологических наук,
кандидат медицинских наук, профессор

Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Мелиоидоз – опасное и потенциально смертельное заболевание людей, регистрируемое в эндемичных для этой инфекции регионах юго-восточной Азии и Северной территории Австралии (Brea D. Duval et al., 2014). Этиологическим агентом мелиоидоза является *Burkholderia pseudomallei*, бактерия II группы патогенности.

В национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, США и ряда европейских стран возбудитель мелиоидоза включен в список В потенциальных агентов террористических угроз (Онищенко Г. Г., 2003) по следующим критериям: высокий уровень заболеваемости и смертности (Puthucheatry S.D. et al., 2002), отсутствие эффективных схем лечения (DeShazer D. et al., 2001; Masoud H. et al., 1997), устойчивость в отношении широкого спектра антибиотиков (Wiersinga, W. J. et al., 2006), отсутствие безопасных и эффективных средств специфической профилактики мелиоидоза (Brett P. J. et al., 2000).

В нашей стране до сих пор не зарегистрировано ни одного достоверного случая заболевания мелиоидозом. В то же время, существование эндемичных очагов распространения инфекции в тропической и субтропической зонах Южной и Юго-Восточной Азии, на севере Австралии и в Океании, регистрация спорадических случаев болезни в странах Африки, Америки, наличие единичных заболеваний завозного характера в США, Франции, Англии, Нидерландах, Турции, обуславливает настороженность со стороны медицинской и санитарной служб нашей страны в отношении возможных случаев завоза инфекции (Илюхин В. И. с соавт., 2010; Илюхин В. И., Сенина Т. В., 2012; Limmathurotsakul D. et al., 2013). Сведения о возможном распространении мелиоидоза за пределы эндемичных регионов привели к росту исследований в области эпидемиологии, диагностики и терапии данного заболевания (Malnick H. et al., 2007; Price E. P. et al., 2013; Niyompanich S et al., 2014).

В настоящее время определен порядок организации и проведения лабораторной диагностики мелиоидоза в специализированных лабораториях (Лабораторная диагностика мелиоидоза, МУ 4.2.2787-10; Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. МУ 3.4.3008-12; Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практ. рук., 2013), регламентированы этапы воспроизведения схемы специфической индикации возбудителей особо опасных инфекций, включая *Burkholderia pseudomallei* (Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практ. рук., 2006).

Согласно этим документам на этапах иммунодиагностических исследований используют следующие методы и средства обнаружения возбудителя мелиоидоза: метод флуоресцирующих

антител (МФА) с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими мелиоидозными моноклональными, твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) с тест-системой иммуноферментной для обнаружения антигенов возбудителей сапа и мелиоидоза, приготовленной на основе поликлональных антител, а также реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) с диагностикумом эритроцитарным сапным и мелиоидозным иммуноглобулиновым сухим.

В то же время, продолжают исследования, направленные на расширение спектра иммунодиагностических средств, параметры качества которых соответствуют современным требованиям в части использования высокоспецифичных моноклональных антител (МКА), взаимодействующих с диагностически значимой антигеном-мишенью конкретного микроорганизма. МКА в качестве компонентов иммунодиагностических тестов для обнаружения возбудителей особо опасных инфекций обеспечивают наиболее высокую чувствительность, специфичность и стандартизацию препаратов (Онищенко Г.Г., 2002; Храпова Н. П. с соавт., 2011; Nara Y. et al., 2013; Rammaert B. et al., 2014).

В качестве потенциальных мишеней для создания эффективных средств иммунодиагностики мелиоидоза рассматривают основные детерминанты вирулентности *B. pseudomallei*, к которым отнесены экзопротеазы, гемолизины, мембранные белки, капсульные биополимеры, в том числе антиген 8, в состав которого входит гликопротеин 200 kDa (Пивень Н. Н., 2000, 2005; Reckseidler-Zenteno S. L. et al., 2005; Scott A. E. et al., 2014; Houghton R. L. et al., 2014).

Одним из перспективных направлений в области совершенствования средств и методов обнаружения возбудителя мелиоидоза является разработка специфичных иммунобиологических препаратов медицинского назначения, позволяющих не только быстро и эффективно выявлять *B. pseudomallei*, дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы этого микроорганизма, выделяемые из проб клинического материала и объектов внешней среды, но и проводить дифференциацию патогенных буркхольдерий от условно-патогенных и других микроорганизмов (Антонов В. А. с соавт., 2012; Nara Y. et al., 2013; Rammaert B. et al., 2014).

В настоящее время в диагностических тестах чаще всего применяют МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* (Steinmetz I. et al., 2002) или поверхностно локализованному антигену капсулы *B. pseudomallei* (Rugdech P. et al., 1995). На их основе изготавливают препараты и тест-системы для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов или используют в реакции агглютинации бактерий. Известно, что дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы этого возбудителя, выделяемые из проб клинического материала и объектов внешней среды, возможно по их способности ассимилировать L-арабинозу и по

наличию на их поверхности 200 kDa антигена (Anuntagool N. et al., 2000; Sirisinha S. et al., 2000). В связи с этим, в последнее время сформировалось одно из приоритетных направлений современной иммунодиагностики - совершенствование лабораторной диагностики мелиоидоза, направленное на разработку препаратов и тест-систем на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, предназначенных для обнаружения этого антигена, выполняющего роль маркера вирулентности, в исследуемых пробах.

Цель исследования - оценка эффективности использования панели МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei* в качестве основы для изготовления иммунодиагностических препаратов и тест-систем, предназначенных для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий.

Задачи исследования

1. Оценить свойства гибридом-продуцентов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, выведенных из криоконсервированного состояния, их жизнеспособность, эффективность восстановления пролиферативной активности и функции антителопродукции.
2. Накопить в препаративных количествах ряд МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза и отобрать гибридомы с высокими показателями АТ-продукции и прививаемости в организме животных.
3. Изучить свойства МКА в различных методах, подтвердить специфическое взаимодействие МКА с эпитопами, экспонированными на антигене 200 kDa возбудителя мелиоидоза, с помощью иммуноблоттинга, иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализов и оценить перспективы их применения.
4. Приготовить образцы МКА, меченных флуорохромом, для МФА и меченных ферментом для ТИФМ, оценить диагностические возможности экспериментальных препаратов и тест-системы в части обнаружения и идентификации антигенной мишени в различных пробах.

Научная новизна

Впервые получена разноплановая характеристика МКА, составляющих панель к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, как маркера вирулентных штаммов *B. pseudomallei*. Показана специфичность взаимодействия МКА с возбудителем мелиоидоза в различных методах (ТИФМ, МФА, иммуноблоттинг).

Подобраны диагностически значимые пары антител, выявляющие пространственно удаленные друг от друга эпитопы, представленные с высокой плотностью на поверхности микробной клетки *B. pseudomallei*.

Впервые разработана технологическая схема изготовления экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА 3C₆ и 5C₂ к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, предназначенной для обнаружения этого антигена в различных смесях и пробах биологического материала.

Научная новизна подтверждается двумя заявками на изобретение: «Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* Bpm Vd-8 – продуцент моноклонального антитела 3C₆/A₉ к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза» зарегистрирована в ФИПС № 2014115304 от 18.04.2014; «Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus musculus* Bpm Vd-9 – продуцент моноклонального антитела 5C₂/F₁₀/C₉ к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза» зарегистрирована в ФИПС № 2014115305 от 18.04.2014.

Теоретическая и практическая значимость работы

Штаммы гибридных клеток – продуценты МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* Bpm Vd-8 (3C₆/A₉) и Bpm Vd-9 (5C₂/F₁₀/C₉) депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур («ГКПМ – БОЛЕНСК») с присвоением регистрационных номеров Н-30 и Н-31 соответственно.

На основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* получены моноклональные флуоресцирующие препараты для МФА, определена эффективность и специфичность их применения при работе с чистыми культурами патогенных буркхольдерий и образцами проб биологического материала экспериментальных животных.

Разработана и испытана иммуноферментная тест-система на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза для выявления антигена 200 kDa в различных объектах исследования. «Тест-система иммуноферментная для выявления антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза» прошла контрольные лабораторные испытания (Протокол № 1/14 от 30.04.14. Утвержден директором института 30.04.14).

Результаты исследований использованы при разработке трех Методических рекомендаций учрежденческого уровня внедрения: «Методические рекомендации по применению моноклональных антител для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза» (Рассмотрены ученым советом 31.10.2012, протокол № 18. Утверждены директором института 31.10.2012); «Методические рекомендации по применению средств индикации и идентификации возбудителей мелиоидоза и сапа на основе моноклональных антител в режимах

повседневной деятельности и чрезвычайных ситуаций» (Рассмотрены ученым советом 26.12.2013, протокол № 12. Утверждены директором института 26.12.2013); «Методические рекомендации по применению преципитирующих моноклональных антител для обнаружения гликопротеина 200 kDa возбудителя мелиоидоза в реакции иммунодиффузии в геле» (Рассмотрены ученым советом 30.04.2014, протокол № 6. Утверждены директором института 30.04.2014).

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), гибридная технология, иммунохимические методы (ТИФМ, РИД, МФА, иммуноблоттинг), биохимические и микроскопические.

Положения, выносимые на защиту

1. МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза являются эффективной основой для изготовления препаратов и тест-систем, предназначенных для выявления этого антигена в различных объектах исследования.

2. Экспериментальная тест-система иммуноферментная, сконструированная с применением МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, позволяет выявлять до 2,5 мкг/мл антигена 200 kDa в водорастворимой форме. Эффективность и специфичность выявления данного антигена доказана при постановке реакции с водно-солевыми и экстрацеллюлярными экстрактами капсулообразующих буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов.

3. МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, меченные флуоресцеинизотиоцианатом, высоко активны при исследовании чистых культур микробных клеток возбудителей мелиоидоза, сапа и гетерологичных микроорганизмов, а также при работе с пробами биологического материала.

4. Иммуноглобулины флуоресцирующие и тест-система иммуноферментная, разработанные на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, способны расширить возможности экспресс - идентификации вирулентных штаммов *B. pseudomallei* в случаях работы с пробами неизвестного материала.

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертации представлены на X Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (Ставрополь, 2010), научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2011), доложены на 69-ой

открытой научно - практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2011), конференции молодых ученых ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Волгоград, 2012), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), XX Юбилейном конгрессе «Человек и лекарства» (Москва, 2013), V Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2013г), Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013), научной-практической конференции молодых ученых «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014).

План и аннотация диссертации обсуждены и одобрены на заседании ученого совета ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 31.03.2010 г., протокол № 3.

Результаты исследований обсуждены на общеинститутской конференции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 10.06.2014 г., протокол № 6.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, включающие 8 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 6 рисунками и 17 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения и выводов. Список использованных источников литературы включает 162 работы (43 отечественных и 119 зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе было использовано: 1) 70 штаммов микроорганизмов II и 9 штаммов III-IV групп патогенности, полученных из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора: *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. gladioli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*; 2) линии мышинных перевиваемых гибридных клеток-продуцентов МКА против антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза из коллекции лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, постоянно сохраняемые в жидком азоте при -196°C ; 3) лабораторные животные из питомника института (инбредные белые мыши линии BALB/c, массой 12 – 16 г обоих полов).

1. Водорастворимые антигены (ВСЭ) готовили из ацетонвысушенных клеток буркхольдерий или других микроорганизмов методом водно-солевой экстракции. При получении гликопротеина *B. pseudomallei* источником выделения гликопротеина капсульного вещества возбудителя мелиоидоза являлись обеззараженные ацетоном и высушенные клетки штамма *B. pseudomallei* 100, экстракцию осуществляли формамидом по методу Фуллера в модификации Пивня Н. Н. (Пивень Н. Н., 1990). Экстрацеллюлярные экстракты (ЭЦА) изолировали из жидкой среды выращивания буркхольдерий (Отчёт о НИР.-№ ГР 01.2.006 08604, 2010).

Моноклональные антитела к гликопротеину 200 kDa различной эпитопной направленности накапливали в препаративных количествах после размораживания всех вариантов гибридом-продуцентов и проведения последовательных этапов их тиражирования (Фрешни Р. Я., 2010). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5 % CO_2 и 70-80 % влажности с использованием среды RPMI-1640 с добавлением 15 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина, пирувата натрия (Goding J. W., 1986). Антителопродукцию контролировали с помощью непрямого варианта ТИФМ по общепринятой методике (Антитела. - М., 1991). Твердую фазу (Costar high binding, США) нагружали контрольным АГ - гликопротеином 200 kDa *B. pseudomallei* 100.

Накопление антител *in vivo* осуществляли с помощью внутрибрюшинного введения $1-5 \cdot 10^6$ клеток гибридом линейным мышам BALB/c, предварительно праймированным пристаном. МКА выделяли из асцитической жидкости (АЖ) мышей методом трёхкратного пересадения белка сульфатом аммония (O'Berry P.A., 1964). В непрямом методе флюоресцирующих антител оценивали специфическую активность МКА, а с помощью реакции иммунодиффузии подтверждали их гомогенность и видовую принадлежность.

Определение изотипа антител проводили с помощью набора реагентов фирмы SIGMA согласно методике, описанной в инструкции к набору (Antigen-mediated ELISA).

Данные о конкурентных взаимоотношениях МКА были получены с помощью метода, предложенного Friguet B. с соавторами (Friguet B., 1983). Аффинность МКА вычисляли по методике Beatty J.D. (Beatty J. D., 1987).

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).

Определение рабочего разведения и отбор МКА для последующего 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»). Полученные изображения анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab TL120»[©] («TotalLab Ltd.»).

Моноклональные иммуноглобулины конъюгировали с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ), полученные конъюгаты очищали от несвязавшегося флуорохрома гель-фильтрацией (сефадекс G-25) на хроматографической колонке. Спектр специфической активности флуоресцирующих МКА определяли в методе флуоресцирующих антител на наборе штаммов *B. pseudomallei*, специфичность – на наборе штаммов других видов буркхольдерий и псевдомонад. Для проверки диагностических возможностей конъюгатов МКА+флуорохром при исследовании проб биологического материала использовали мазки-отпечатки селезенок биопробных животных, инфицированных *B. pseudomallei*.

Иммунпероксидазные конъюгаты (ИПК) получали по методу Nakane P. K., Kawaoi A. (Nakane P. K., Kawaoi A., 1974). 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 исследований и обсуждение

Накопление и отбор перспективных МКА

В работе была использована коллекция гибридом-продуцентов моноклональных антител против антигена 200 kDa, полученная в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Необходимо было паспортизировать эти гибридомы и изучить свойства всех вариантов, продуцируемых ими МКА, во взаимодействии с различными антигенами возбудителей мелиоидоза, сапа и гетерологичных микроорганизмов: формамидными, водно-солевыми и экстрацеллюлярными экстрактами микробных клеток, взвесями музейных штаммов, обеззараженными автоклавируанием.

При этом все растворимые антигенные комплексы были охарактеризованы по химическому составу и антигенному профилю. Определено, что в составе всех проб ВСЭ и ЭЦА антигенов присутствовали высокомолекулярные биополимеры с м.м. 200 kDa. Дифференциальная окраска полученных электрофореграмм на определение белковых и

гликопротеиновых фракций, продемонстрировала факт гликопротеиновой природы использованных в работе ФЭ штамма *B. pseudomallei* 100, (фракция занимала область м.м. от 202,9 kDa до 57,5 kDa), в то время как в антигенном профиле ВСЭ штамма *B. pseudomallei* 100 биополимеры гликопротеиновой природы присутствовали в небольшом количестве. Результаты дифференциального окрашивания представлены на рисунке 1.

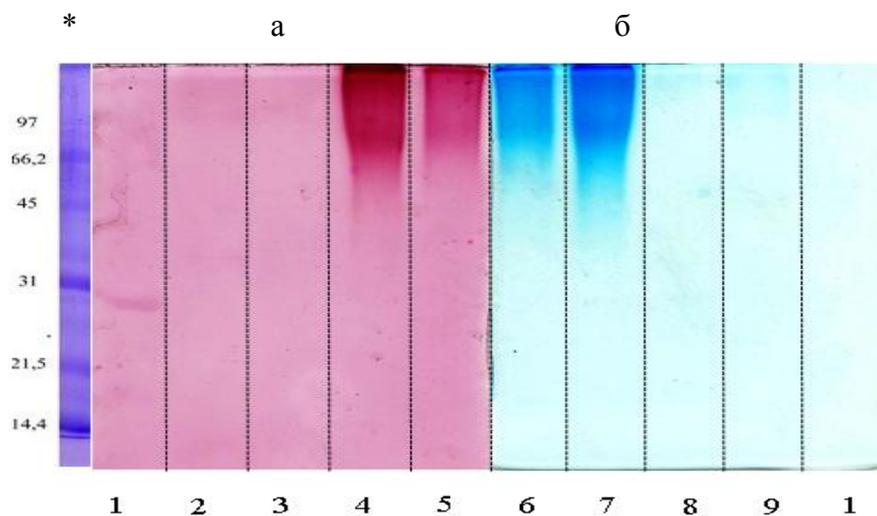


Рисунок 1 - Дифференциальное окрашивание гелей после SDS-PAGE реактивом Шиффа с йодной кислотой (а) и алциановым синим (б), Кумасси синим R-250 (*).

1 – маркеры м.м.; 2, 9 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 3, 8 – 5 серия ФЭ *B. pseudomallei* 100; 4, 7 – контрольная серия ФЭ *B. pseudomallei* 100; 5, 6 – 7 серия ФЭ *B. pseudomallei* 100.

Для получения образцов МКА против антигена 200 kDa *B. pseudomallei*, коллекция гибридных клеток была последовательно выведена из криоконсервированного состояния. Относительные показатели жизнеспособности, определенные сразу после их размораживания, свидетельствовали о хорошем состоянии коллекционных образцов гибридом-продуцентов МКА, взаимодействующих с эпитопами гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei* (рис. 2).

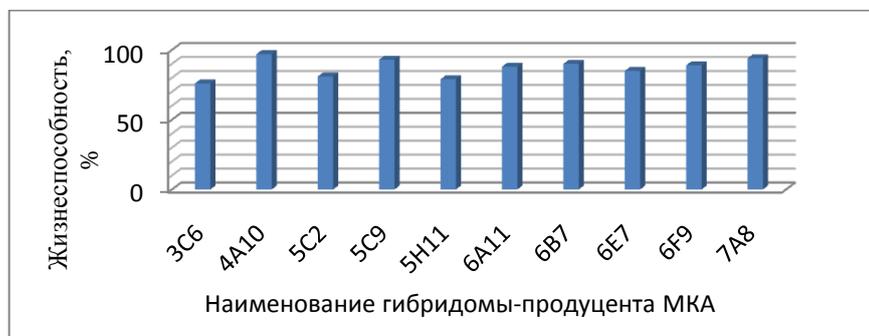


Рисунок 2 - Относительные показатели жизнеспособности гибридом-продуцентов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, сохранявшихся в криоконсервированном состоянии в течение 3-4 лет.

Дальнейшие этапы работы были связаны с накоплением МКА *in vitro* и *in vivo*. Культивирование гибридных клеток проводили в ростовой среде с добавлением необходимых компонентов (ЭТС, глутамин, пируват и витамины) по общепринятым рекомендациям, что способствовало оптимальной пролиферативной активности клеток. При этом на всех этапах культивирования оценивали интенсивность антителопродукции с помощью тестирования в ТИФМ. Пассирование гибридом *in vitro* позволило нарастить клетки для последующего введения мышам (этап накопления МКА *in vivo*).

Важными показателями для гибридомы, свидетельствующими об ее индивидуальности, являются прививаемость в организме животных и способность к асцитобразованию (накопление *in vivo*). Наилучшие показатели были зарегистрированы у гибридомы 5C₂ (табл. 1).

Все варианты МКА, использованные в работе, были охарактеризованы по изотипу, эпитопной направленности, константам аффинности, концентрации белка, специфической активности в ТИФМ, РИД, блоттинге.

При изотипировании МКА установлено, что девять из них относятся к классу IgM (3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6A₁₁, 6B₇, 6E₇, 7A₈) и один – к IgA (6F₉).

Таблица 1 - Прививаемость различных гибридом *in vivo*

Наименование гибридомы-производителя МКА	Показатель прививаемости гибридом <i>in vivo</i> , в процентах	Объем полученных АЖ, в мл (M±σ)
3C ₆	88	3,1±0,4
4A ₁₀	75	2,9±1,2
5C ₂	94	4,8 ± 0,7
5C ₉	88	2,2 ± 0,4
5H ₁₁	78	4,2±1,7
6A ₁₁	92	3,2 ± 0,4
6B ₇	84	4,5±2,1
6E ₇	72	4,0 ± 0,7
6F ₉	64	3,9±1,5
7A ₈	58	3,1 ± 0,6

Примечание:

1. АЖ - асцитическая жидкость;
2. М - средняя арифметическая величина;
3. σ – стандартное отклонение.

Исследование образцов МКА в ТИФМ позволило выявить варианты, наиболее активно взаимодействующие с контрольным антигеном (формаидный экстракт *B. pseudomallei* 100). Образцы иммуноглобулинов, изолированных из АЖ мышей, в ТИФМ обладали более высокой активностью антител, чем МКА, полученные из среды культивирования гибридом. В связи с

этим, в последующих экспериментах по оценке пригодности МКА в качестве ингредиентов иммунодиагностических препаратов и тест-систем использовали образцы иммуноглобулинов, изолированных из АЖ мышей.

С помощью НМФА были получены данные об удельной активности исследуемых иммуноглобулинов, получены доказательства поверхностной локализации на микробной клетке высоковирулентного штамма *B. pseudomallei* 100 эпитопов, узнаваемых каждым из изученных вариантов МКА. В результате выполнения этого метода были отобраны МКА, потенциально являющиеся перспективной основой для изготовления экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих (МКА 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6B₇, 6E₇, 7A₈).

Данные об удельной активности МКА представлены на рисунке 3.

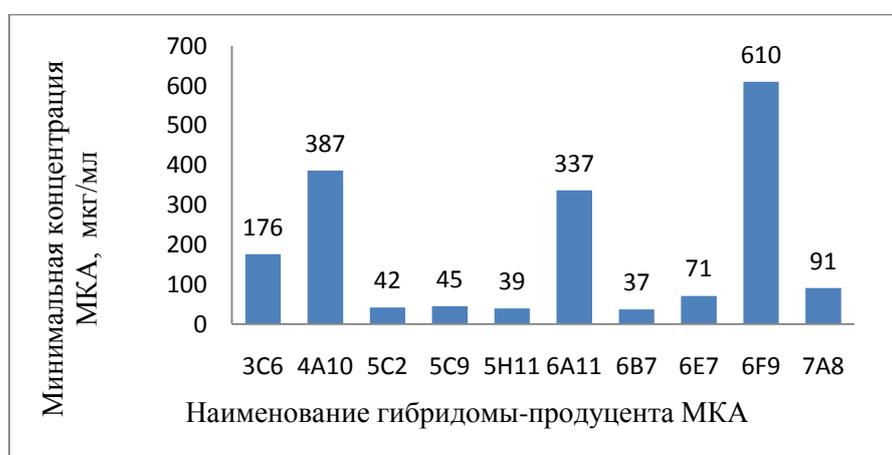


Рисунок 3 - Сводные данные проверки МКА, накопленных *in vitro*, в НМФА с *B. pseudomallei* 100.

Гомогенность и видовая принадлежность всех образцов МКА была подтверждена при постановке РИД с антивидовой кроличьей сывороткой. С помощью реакции двойной иммунодиффузии в геле была доказана возможность использования МКА для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза. Сводные данные эффективности обнаружения антигена 200 kDa в ВСЭ различных штаммов возбудителя мелиоидоза представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сводные данные эффективности обнаружения антигена 200 kDa в РИД с ВСЭ различных штаммов возбудителя мелиоидоза

Показатель обнаружения антигена 200 kDa, (n=11)	Наименование МКА						
	3C ₆	4A ₁₀	5C ₂	6A ₁₁	6E ₇	6F ₉	7A ₈
Абсолютное значение	9	8	4	9	8	1	4
Относительное значение, в процентах	81	72	36	81	72	9	36

Примечание: 1. МКА были взяты в концентрации от 12 до 15 мг/мл;
2. ВСЭ из м.к. штамма *B. pseudomallei* в концентрации от 10 до 12 мг/мл.

Установлено, что 7 типов МКА из 10 в разной степени проявили преципитирующую активность. Наибольшей специфической активностью в РИД обладали МКА 3С₆ и 6А₁₁, выявляя антиген 200 kDa у 81 % коллекционных штаммов *B. pseudomallei*. При этом образцы МКА образовывали преципитаты только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов. Этот факт заслуживает внимания, так как, по данным литературы, подавляющее большинство экспериментальных препаратов и тест-систем, предназначенных для обнаружения возбудителя мелиоидоза, не позволяют дифференцировать эти буркхольдерии.

Привлечение в работу метода иммуноблоттинга с применением образцов ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и различных серий ФЭ *B. pseudomallei* 100 позволило получить представление об эпитопной плотности и направленности использованных в работе МКА. Так, ИПК 5С₂ выявлял наибольшее количество эпитопов в составе макромолекулярного биополимера (табл. 3).

Таблица 3 - Эпитопная направленность МКА к антигенам *B. pseudomallei*

Наименование МКА	Выявленные эпитопы на биополимерах с м.м. (kDa) в составе:	
	ВСЭ	ФЭ
5С₂	37, 36, 35, 34, 30, 26, 24, 21, 18,4	37, 33, 22, 18,6
4А ₁₀	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6
6F ₉	37, 36, 35, 34, 26, 18,4	33, 22, 18,6
6А ₁₁	37, 36, 35, 34, 26, 21	33, 22, 18,6
6В ₇	37, 36, 35, 34, 26, 21	37, 33, 22, 18,6
6В ₇	52, 35, 34, 30	-
6Е ₇	37, 36, 35, 34, 26	33, 22, 18,6
7А ₈	37, 35, 34, 18,4	33, 22, 18,6

Для окончательного выбора диагностически ценных МКА необходимо было располагать данными о константах аффинности и конкурентных взаимодействиях исследуемой панели МКА. Вычисление величин констант аффинности МКА позволило определить варианты моноклональных иммуноглобулинов, наиболее прочно связывающихся с эпитопами на поверхности контрольного антигена (табл. 4). А с помощью изучения конкурентных взаимоотношений МКА были подобраны пары МКА для последующего использования при конструировании экспериментальной тест-системы иммуноферментной (табл. 5)

Таким образом, из имеющейся панели из десяти МКА были сформированы диагностически значимые пары высокоаффинных антител, не конкурирующих за общие сайты связывания на антигене.

Таблица 4 - Результаты расчета индексов аддитивности МКА

Наименование МКА	Значение $K_{\text{aff}} (M^{-1})$
$3C_6$	$9 \cdot 10^5$
$5C_2$	$2 \cdot 10^8$
$2A_6$	$8 \cdot 10^7$
Показатели константы аффинности соответствуют средней арифметической ее величины (M).	

Таблица 5 - Результаты расчета индексов аддитивности МКА

Наименование МКА	Индексы аддитивности МКА, $M \pm \sigma$, в процентах	
	$3C_6$	$5C_2$
$2A_6$	$72,29 \pm 6,12$	$100 \pm 5,24$
$3C_6$	*	$100 \pm 13,12$
M - средняя арифметическая величина; σ – стандартное отклонение.		

Разработка препаратов на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза для МФА

Для изготовления образцов экспериментальных препаратов иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих мелиоидозных МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, выделенные из асцитической жидкости, конъюгировали с флуорохромом. Полученные после метки параметры конъюгатов показали, что из 10 типов МКА лишь четыре ($3C_6$, $5C_2$, $5H_{11}$, $6A_{11}$) пригодны для дальнейшего изучения в МФА. Полученные препараты характеризовались высокими показателями специфической активности в отношении различных штаммов гомологичного вида *B. pseudomallei* (табл. 6).

Таблица 6 - Определение спектра специфической активности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих моноклональных в отношении *B. pseudomallei*

Штаммы <i>B. pseudomallei</i> (n=31)	Наименование конъюгата МКА-ФИТЦ			
	$3C_6$	$5C_2$	$5H_{11}$	$6A_{11}$
Относительный показатель выявляемости штаммов, %	51	49	47	53

При изучении перекрестной активности полученных экспериментальных препаратов было установлено, что 3C₆, 5H₁₁ и 6A₁₁ взаимодействуют с возбудителями сапа и мелиоидоза, но ни с одним из штаммов гетерологичных микроорганизмов, взятых в работу. В свою очередь, конъюгат, изготовленный на основе МКА 5C₂, обладал перекрестной активностью в отношении *B. thailandensis* и *B. cepacia* (выявлял по 1 из 5 штаммов каждого из этих видов условно-патогенных микроорганизмов). Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Определение специфичности конъюгатов МКА-ФИТЦ

Абсолютный показатель выявляемости штаммов	Наименование конъюгата МКА-ФИТЦ				
	1F ₄ *	3C ₆	5C ₂	5H ₁₁	6A ₁₁
<i>B. mallei</i> (n=10)	-	5	1	2	10
<i>B. thailandensis</i> (n=5)	5	-	1	-	-
<i>B. cepacia</i> (n=5)	-	-	1	-	-
<i>B. gladioli</i> , <i>P. putida</i> (n=4)	-	-	-	-	-

Примечание – (*) - препарат сравнения на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза, который согласно его паспортным данным, в рабочем разведении выявляет только *B. pseudomallei*, не взаимодействует с *B. mallei* и обладает кросс-реактивностью в отношении *B. thailandensis*.

Получены данные свидетельствуют об отсутствии кросс-реактивности МКА 3C₆, 6A₁₁, 5H₁₁ в отношении *B. thailandensis*, что отличает эти варианты антител от производимого в настоящее время коммерческого препарата на основе МКА 1F₄ к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза. Эти данные представляют интерес в связи с тем, что *B. thailandensis* имеет близкое антигенное родство с высоковирулентными патогенами человека и животных *B. pseudomallei* и *B. mallei*, но обладает гораздо меньшей вирулентностью по сравнению с ними.

Дальнейшая работа была посвящена изучению диагностических возможностей экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных при воспроизведении регламентированной схемы индикации возбудителей особо опасных инфекций в части исследования биопробного материала (табл. 8).

Таблица 8 - Результаты обнаружения возбудителя мелиоидоза в мазках-отпечатках селезенки биопробных животных с помощью МФА

Объект исследования	Инфицирующий агент	Срок после заражения (сут)	Конъюгат МКА-ФИТЦ				
			3С ₆	5С ₂	5Н ₁₁	6А ₁₁	1F ₄ *
Мазки-отпечатки селезенки золотистых хомячков	<i>B. pseudomallei</i> 101	3	-	-	-	-	-
		21	+	+	+	+	+
	<i>B. pseudomallei</i> 102	3	-	-	+	+	+
		21	+	+	+	+	+

Примечание: 1. (-) - отрицательный результат МФА;
 2. (+) - положительный результат реакции;
 3. * - препарат сравнения на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза.

Данные, представленные в таблице 8, свидетельствуют о том, что все четыре варианта экспериментальных препаратов (3С₆, 5С₂, 5Н₁₁, 6А₁₁) пригодны для исследования биологического материала. Сроки обнаружения патогенов в мазках-отпечатках селезенки зависели от содержания антигена-мишени в штаммах микробных клеток, применявшихся для моделирования острой формы экспериментального мелиоидоза. Так, при сравнении показателей через 3 суток и через три недели после заражения животных, были получены данные о повышении концентрации антигена-мишени. Это было напрямую связано с вирулентностью штаммов, которая способствовала росту обсемененности селезенки микробными клетками и, соответственно, увеличению на поверхности микробных клеток антигена 200 kDa.

Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

Экспериментальная тест-система представляет собой сэндвич-вариант ТИФМ и была сконструирована по следующей схеме: АТ₁+АГ+АТ₂ (ИПК).

При ее конструировании в качестве АТ₁ была выбрана смесь из трех МКА (3С₆+5С₂+2А₆), белковая нагрузка на твердую фазу - 20 мкг/мл. Экспериментально доказано, что повышение белковой нагрузки на пластины до 50 мкг/мл существенно снижает чувствительность тест-системы.

Для приготовления АТ₂ (иммунопероксидазного конъюгата) – одного из компонентов экспериментальной иммуноферментной тест-системы, предназначенной для выявления антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100, были взяты все варианты МКА. Оптимальным по своим параметрам оказался конъюгат на основе МКА 5С₂.

После завершения этапов получения иммунопероксидазных конъюгатов и их характеристики, оптимизации условий подготовки твердой фазы была подобрана наиболее эффективная композиция ингредиентов тест-системы: АТ₁ (3С₆+5С₂+2А₆) + антиген + АТ₂ (ИПК 5С₂ в рабочем разведении).

При оценке диагностических возможностей экспериментальной тест-системы для обнаружения антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100 в контрольном образце антигена (формамидный экстракт *B. pseudomallei* 100) были получены доказательства того, что оптимизированные условия подготовки твердой фазы в сочетании с применением ИПК на основе МКА 5С₂ обеспечивают высокую чувствительность иммуноферментного анализа, сопоставимую с данными литературы (2,5 мкг/мл).

Тест-система была апробирована для обнаружения антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, обеззараженных автоклавированием и микробных взвесах, обработанных формалином. В результате сводные данные чувствительности экспериментальной тест-системы иммуноферментной для обнаружения антигена 200 kDa не соответствовали рекомендуемым параметрам для ТИФМ, так как тест-система обнаруживала не более 10 % штаммов с чувствительностью выше 10⁷ м.к./мл.

Низкую чувствительность можно объяснить тем фактом, что эпитопы, гомологичные МКА, входящим в состав экспериментальной тест-системы, претерпевают необратимые изменения во время процессов автоклавирования микробных взвесей или при обеззараживании их формалином, вследствие чего нарушается их эффективное связывание с МКА.

Следующим разделом работы явилось изучение чувствительности тест-системы при работе с различными образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100. Определенный диапазон в чувствительности при работе с несколькими образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100 позволяет сделать вывод о том, что разработанная тест-система дает возможность выявлять различия в качестве серий образцов гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*, который используют как заведомо положительный контроль в ряде диагностических тестов. В связи с этим, следует обратить внимание на повышение контроля за условиями подготовки сырья (обеззараженных ацетоном бактерий), из которого получают стандартизированные серии контрольного антигена.

Обнаружение антигена 200 kDa в ВСЭ капсулообразующих буркхольдерий II-III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. ceracia*) с помощью экспериментальной тест-системы подтвердило ее пригодность для анализа водно-солевых экстрактов антигенов с точки зрения содержания в них антигена 200 kDa (рис. 4). Установлено, что количественное содержание этого антигена в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов составляла следовые количества.

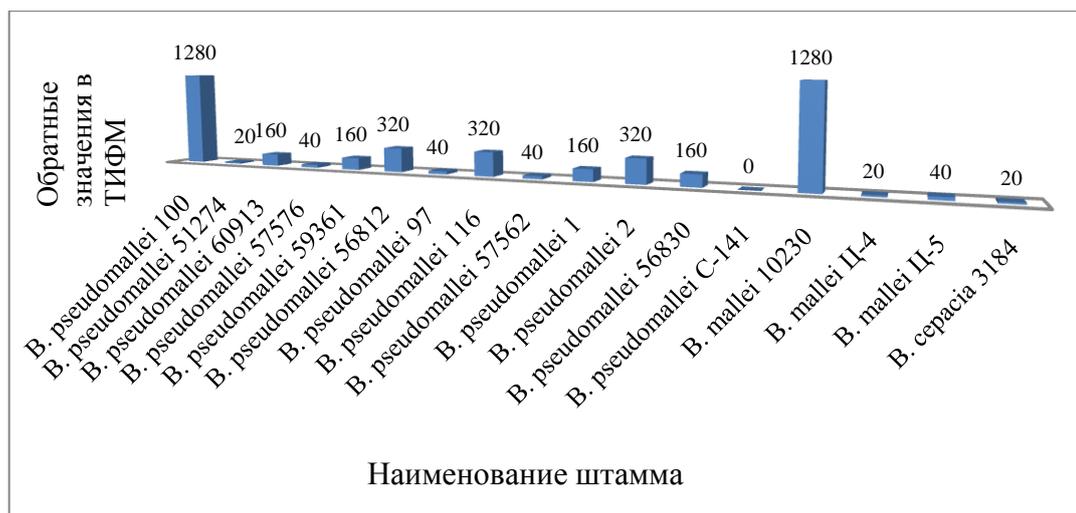


Рисунок 4 - Эффективность обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ патогенных буркхольдерий в ТИФМ, (титр обнаружения контрольного антигена 1/2560, что соответствует 2,5 мкг/мл по белку).

Для выполнения сравнительного анализа содержания антигена 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* в ВСЭ и ЭЦА возбудителей сапа и мелиоидоза была использована разработанная тест-система (табл. 9).

Таблица 9 – Чувствительность ТИФМ при использовании экспериментальной тест-системы иммуноферментной для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ и ЭЦА патогенных буркхольдерий, (мкг/мл)

Штамм	АГ	Количество АГ, выявляемого в ТИФМ с помощью экспериментальной тест-системы иммуноферментной, мкг/мл			
		100	50	25	10
<i>B. pseudomallei</i> 57576	ВСЭ	-	-	-	-
	ЭЦА	+	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 100	ВСЭ	+	+	+	-
	ЭЦА	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> 59361	ВСЭ	+	-	-	-
	ЭЦА	+	+	-	-
<i>B. pseudomallei</i> C-141	ВСЭ	-	-	-	-
	ЭЦА	+	+	+	-
<i>B. pseudomallei</i> 110	ВСЭ	-	-	-	-
	ЭЦА	+	+	+	-
<i>B. mallei</i> Ц-5	ВСЭ	+	-	-	-
	ЭЦА	+	+	-	-
<i>B. mallei</i> Ц-4	ВСЭ	-	-	-	-
	ЭЦА	-	-	-	-

Примечание:
 (-) - отрицательный результат реакции;
 (+) – положительный результат реакции.

Содержание антигена 200 kDa в ЭЦА оказалось выше, чем в ВСЭ клеток буркхольдерий, что подтверждает опытные данные, полученные Anuntagool N. с соавторами в 2000 г. Данный факт объясняется особенностями приготовления этих двух антигенных смесей и отличиями в содержании капсульного вещества у различных штаммов буркхольдерий. Так, сопоставив условные показатели содержания этого биополимера как в ультразвуковых дезинтегратах м.к. (т.е. ВСЭ) и жидкой питательной среде выращивания – источнике экстрацеллюлярных антигенов (ЭЦА), удалось определить наиболее эффективные источники выделения этого антигена и тем самым повысить технологичность процесса получения стандартного образца антигена.

В целом, результаты настоящих исследований подтвердили возможность использования МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза в качестве ингредиентов для изготовления медицинских иммунобиологических препаратов для достоверного выявления возбудителя мелиоидоза и его гликопротеина 200 kDa. Экспериментальные образцы для МФА и ТИФМ проявили себя как эффективные диагностические средства, взаимодействующие только с патогенными буркхольдериями и их антигенами.

Выводы

1. Моноклональные антитела против эпитопов гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei* являются эффективными реагентами для иммунодиагностических реакций, направленных на выявление патогенных буркхольдерий и их дифференциации от условно-патогенных и непатогенных буркхольдерий.

2. Гибридомы-продуценты МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, длительно сохраняемые в криоконсервированном состоянии, после размораживания характеризуются высокими показателями жизнеспособности (более 70 %), пролиферативной активности и постоянством сохранения функции антителопродукции.

3. Индивидуальные характеристики каждого варианта МКА в составе панели специфических иммуноглобулинов к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза свидетельствуют об их различной эпитопной направленности, высокой специфической активности в отношении антигенной мишени, а также являются основой для корректного подбора сырья при изготовлении различного типа препаратов или тест-систем.

4. С помощью непрямого метода флуоресцирующих антител представлены доказательства того, что эпитопы, узнаваемые МКА к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза, экспонированы на поверхности микробных клеток *B. pseudomallei*.

5. Иммуноглобулины флуоресцирующие, приготовленные на основе МКА 3C₆, 5C₂, 5H₁₁ и 6A₁₁, пригодны для работы как с чистыми культурами различных штаммов *B. pseudomallei*, так и с мазками-отпечатками биологического материала экспериментальных животных. Препараты на основе МКА 3C₆, 5H₁₁ и 6A₁₁ не обладают перекрестной активностью в отношении *B. thailandensis*, что выгодно отличает их от коммерческого препарата на основе МКА 1F₄ (препарат, производимый в настоящее время на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза).

6. Разработана технологическая схема изготовления тест-системы иммуноферментной экспериментальной, предназначенной для обнаружения гликопротеина 200 kDa возбудителя мелиоидоза в водорастворимой форме в различных объектах исследования.

7. Оптимизация выполнения всех этапов технологической схемы позволила определить состав смеси МКА (3C₆+5C₂+2A₆), сорбируемой на твердой фазе, отобрать высокоактивный иммунопероксидазный конъюгат (ИПК 5C₂), что обеспечило тест-системе высокую чувствительность выявления антигена 200 kDa, равную 2,5 мкг/мл.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

а) статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий / Храпова Н. П., Алексеев В. В., Корсакова И. И., Дрефс Н. М., Ломова Л. В., **Булатова Т. В.***, Напалкова Г. М. // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 107, 2011.- С.66-69.

2. **Булатова, Т. В.*** Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза / **Булатова Т. В.***, Храпова Н. П., Барышова А. Ю. // Медицинский академический журнал. Матер. II всероссийской научной конференции молодых ученых “Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия” Санкт-Петербург 12-14 ноября 2012 г.- Санкт-Петербург 2012 г.- С. 307-309.

3. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхольдерий / Корсакова И. И., Храпова Н. П., Напалкова Г. М., Ломова Л. В., Дрефс Н. М., Голосеев Ю. А., **Булатова Т. В.*** // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 113, 2012.- С.82-85.

4. **Замарина Т. В.** Конструирование экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной: определение констант аффинности антител / **Замарина Т. В.** // Инфекция и иммунитет.- 2014.- Том 4.- №1.- С. 67.

5. Изучение диагностических возможностей экспериментальных препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих, приготовленных на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* / Е. Э. Ким, **Т. В. Замарина** // Инфекция и иммунитет.- 2014.- Том 4.- №1.- С. 71.

6. Определение эпитопной направленности моноклональных антител в иммуноблоттинге / И. И. Корсакова, Н. П. Храпова, **Т. В. Замарина**, Е. В. Пименова, Н. С. Макаров // Инфекция и иммунитет.- 2014.- Том 4.- №1.- С. 73.

7. Использование ускоренного линейного иммуноэлектрофореза для дифференцирования буркхольдерий / И. И. Корсакова, Н. П. Храпова, Г. М. Напалкова, Л. В. Ломова, **Т. В. Булатова*** // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 2, 2014.-С. 94-96.

8. **Замарина Т. В.** Конструирование экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе моноклональных антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза / **Т. В. Замарина**, Н. П. Храпова, И. И. Корсакова, Е. В. Пименова // Вестник ВолГМУ, вып. 3 (51), 2014.-С.93-95.

б) тезисы научных конференций

1. **Булатова, Т. В.*** Свойства флуоресцирующих моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* / **Булатова Т. В.*** // В сб.: 69-ой открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» Волгоград 27-30 апреля 2011 г., С. 167-168.

2. **Булатова Т. В.*** Конъюгаты моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза с флуорохромом: получение и характеристика / **Булатова Т. В.*** // В сб.: научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов НИО Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» Оболенск 31 мая – 2 июня 2011 г.– С. 159-161

3. **Булатова Т. В.*** Экспериментальная тест-система иммуноферментная моноклональная для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза: подбор оптимального состава компонентов/ **Булатова Т. В.***, Храпова Н. П. // В сб. матер. XX Юбилейного конгресса «Человек и лекарства», Москва, 15-19 апреля 2013 г.-С. 247.

4. **Булатова Т. В.*** Эффективность применения тест-системы иммуноферментной моноклональной для оценки активности серий гликопротеина 200 kDa возбудителя мелиоидоза/ **Булатова Т. В.*** // В сб. матер. V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням Москва, 25-27 марта 2013 г. – С.74.

5. **Булатова, Т. В.*** Применение моноклональных антител к гликопротеину 200 kDa возбудителя мелиоидоза для конструирования экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной/ **Булатова Т. В.*** // В сб. матер. Научно–практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» Новосибирск, 26–28 сентября 2013 г.-С.120-123.

«*» - фамилия Булатова изменена на Замарина.

Список сокращений, используемых в тексте

АЖ – асцитическая жидкость

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВСЭ – водно-солевой экстракт

ДМСО – диметилсульфоксид

м.к. – микробная клетка

МКА – моноклональные антитела

м.м. – молекулярная масса

МФА – метод флуоресцирующих антител

НМФА – непрямой метод флуоресцирующих антител

РИД – реакция иммунодиффузии

ТИФМ – твердофазный иммуноферментный метод

ФЭ – формамидный экстракт

ЭЦА – экстрацеллюлярные экстракты

kDa – килодальтон

SDS-PAGE – полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия

Благодарности

Благодарю администрацию ФКУЗ Волгоградский государственный научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в лице его директора, д.м.н., проф. Антонова Валерия Алексеевича за предоставленную возможность выполнения диссертационной работы на базе института.

Приношу искреннюю благодарность своему научному руководителю д.м.н., профессору Храповой Наталье Петровне за оказание всесторонней помощи при выполнении всех этапов работы, в том числе за общую организацию и координацию работы.

Глубоко признательна ведущей организации, официальным оппонентам и всем рецензентам настоящей диссертационной работы.