

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ
ИНСТИТУТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

ЗАМАРИНА ТАТЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА

ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

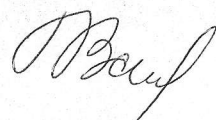
03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Н.П. Храпова

Волгоград – 2014



СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Общие сведения о возбудителе мелиоидоза: актуальность изучения инфекционного агента, антигенный состав	13
1.2 Современное состояние лабораторной диагностики мелиоидоза	23
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Штаммы микроорганизмов	33
2.2 Клеточные линии	33
2.3 Экспериментальные животные	34
2.4 Питательные среды	34
2.5 Антигены	35
2.6 Методы биохимического анализа антигенов	37
2.7 Размораживание гибридом-продуцентов МКА	37
2.8 Реклонирование гибридом-продуцентов МКА	39
2.9 Накопление моноклональных антител в препаративных количествах	40
2.10 Тест-система для скрининга МКА	40
2.11 Метод очистки моноклональных иммуноглобулинов	42
2.12 Методы контроля серологической активности антител	43
2.13 Изотипирование МКА	44
2.14 Изучение конкурентных взаимоотношений пар МКА	44
2.15 Определение аффинности МКА	44
2.16 Методы иммунохимического анализа	45
2.16.1 Характеристика антигенных комплексов вертикальным электрофорезом	45

2.16.2 Обработка гелей после SDS-PAGE на выявление общего, белкового и гликопротеинового антигенного профиля	45
2.16.3 Dot-иммуноанализ	46
2.16.4 Определение эпитопной направленности МКА с помощью иммуноблоттинга	46
2.16.5 Методы обработки данных	47
2.17 Получение экспериментальных образцов МКА, меченных флуорохромом	47
2.18 Получение экспериментальных образцов МКА, меченных пероксидазой хрена (ПХ)	50
2.19 Метка моноклональных антител биотином	51
2.20 Статистические методы обработки результатов опытов	51
ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МКА К АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА	52
3.1 Выведение гибридом-продуцентов из криоконсервированного состояния, адаптация к условиям культивирования	52
3.2 Накопление МКА <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	53
3.3 Выделение и очистка специфических иммуноглобулинов	54
3.4 Характеристика МКА, направленных к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза	55
3.4.1 Характеристика антигенных препаратов	55
3.4.2 Определение специфической активности МКА, накопленных <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	57
3.4.3 Изучение активности МКА с помощью НМФА	58
3.4.4 Определение преципитирующей активности образцов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза	60
3.4.5 Определение класса специфических иммуноглобулинов	62
3.4.6 Определение констант аффинности МКА	62
3.5 Изучение свойств МКА в иммуноблоттинге	67

ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ	71
ИММУНОГЛОБУЛИНОВ	ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНА 200 KDA	
ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА	
4.1 Свойства иммуноглобулинов флуоресцирующих,	71
приготовленных на основе различных вариантов МКА к антигену 200	
kDa возбудителя мелиоидоза	
4.2 Диагностические возможности экспериментальных	75
иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных	
моноклональных	
ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕСТ-	78
СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ НА ОСНОВЕ МКА К	
АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА	
5.1 Биотехнологическая схема получения тест-системы	78
иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя	
мелиоидоза	
5.2 Иммунопероксидазные конъюгаты на основе МКА к антигену	81
200 kDa <i>Burkholderia pseudomallei</i>	
5.3 Подбор компонентов экспериментальной тест-системы	83
иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя	
мелиоидоза	
5.4 Изучение диагностических возможностей экспериментальной	86
тест-системы иммуноферментной моноклональной на основе МКА к	
антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	93
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

ВВЕДЕНИЕ

Мелиоидоз – опасное и потенциально смертельное заболевание людей, распространённое в эндемичных регионах юго-восточной Азии и Северной территории Австралии. Этиологический агент мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, широко распространен в почве и воде эндемичных зон. Большинство случаев заражения происходит при контакте макроорганизма с внешней средой во время вдыхания микроорганизма, при контаминации почвой небольших ран и ссадин, а также путем заглатывания [105, 144].

Клинические формы мелиоидоза разнообразны, от фатальной септицемии до хронической очаговой инфекции. Обычно проявления мелиоидоза представлены острой, подострой и хронической формами. Летальность при несвоевременно начатой терапии у больных септической и лёгочной формой мелиоидоза, по данным ряда авторов, может достигать 90 %, а при лечении самыми современными препаратами в условиях стационара составляет от 19 % (Австралия) и до 51 % (Таиланд) [58; 105, 155, 156].

Известно, что септицемию, вызванную *B. pseudomallei*, трудно дифференцировать с заболеваниями, вызванными другими патогенными микроорганизмами. По мнению ряда авторов [58, 105], истинные масштабы распространения заболевания не ясны. В связи с недостаточным оснащением или полным отсутствием диагностических лабораторий в сельских районах эндемичных регионов мелиоидоз часто не диагностируют.

В России, как и в других странах бывшего СССР, до сих пор не зарегистрировано ни одного достоверного случая мелиоидоза. В то же время, существование эндемичных очагов распространения инфекции в тропической зоне Южной и Юго-Восточной Азии, на севере Австралии и в Океании, регистрация 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 к возможным случаям появления или завоза инфекции.

Так, по данным диагностической службы Великобритании, за период с 1997 по 2007 год имели место 49 завозных случаев мелиоидоза в Европе. Изоляты от больных были идентифицированы как *B. pseudomallei*, 33 случая из них были зарегистрированы в Великобритании и связаны с посещением Таиланда, Бангладеш и Австралии [8, 94].

Согласно принятой классификации, возбудитель мелиоидоза является микроорганизмом II группы патогенности для человека. С 2007 года мелиоидоз внесен в перечень международных медико-санитарных правил (ММСП) в качестве инфекции, требующей постоянного надзора в связи с расширением зон эндемического распространения данного патогена, отсутствием зарегистрированных средств диагностики и специфической профилактики, а также эффективных схем лечения данного заболевания.

Для иммунодиагностики мелиоидоза в схеме индикации и идентификации рекомендовано применение следующих методов экспресс- и ускоренного обнаружения: метод флуоресцирующих антител (МФА) с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими мелиоидозными, твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), а также реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с диагностикумом эритроцитарным сапным и мелиоидозным иммуноглобулиновым [135].

Во ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора был разработан ряд медицинских иммунобиологических препаратов для индикации возбудителя мелиоидоза в различных объектах исследования: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные, тест-система иммуноферментная для обнаружения антигенов возбудителей сапа и мелиоидоза на основе поликлональных антител, диагностикум эритроцитарный сапной и мелиоидозный иммуноглобулиновый [39].

В последние годы среди микробиологов возрос интерес к созданию иммунодиагностических препаратов на основе МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*. Это связано с тем фактом, что выявление вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза, а также их дифференциация от авирулентных вариантов, связана с присутствием в капсуле бактерий гликопротеина с м. м. 200 kDa [44].

Отечественная коллекция гибридом-продуцентов МКА против данного антигена была создана в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, что явилось отправной точкой для разработки направления по изучению перспектив создания диагностических средств индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза на основе МКА к гликопротеину 200 kDa и оценки их диагностических возможностей при работе с вирулентными и авирулентными видами буркхольдерий.

Цель работы – 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 – ОБОЛЕНСК») 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 перспективными в плане изготовления на их основе 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 сапа, мелиоидоза 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» (Оболensk, 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

Результатом научной работы являются 13 публикаций по теме диссертации, включающие 8 статей, опубликованных 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 работ (43 отечественных и 119 зарубежных).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения о возбудителе мелиоидоза: актуальность изучения инфекционного агента, антигенный состав

Широкое распространение мелиоидоза в пределах эндемичных регионов Юго-Восточной Азии и Северной территории Австралии, а также возникновение спорадических случаев этой инфекции в Северной Америке и Европе привело к интенсификации исследований в области эпидемиологии, диагностики и терапии данного заболевания [105, 111, 155].

Несмотря на увеличивающийся запас знаний в области этиологического агента данного заболевания, не решен вопрос о создании средств специфической профилактики, защиты и эффективных средств лечения этой особо опасной инфекции, а также о насыщении отечественного и зарубежного рынка коммерческими диагностическими тест-системами и препаратами [131].

Необходимо отметить, что вопросы доступности стандартных средств обнаружения патогена, лечения заболевания, а также защиты населения от инфицирования *B. pseudomallei* актуальны не только в зонах ее эндемичного распространения, но и в странах, где наличие этой инфекции ранее не отмечали. Это напрямую связано с усилением миграции населения, туристическими и деловыми визитами в эндемичные области, что повышает риск инфицирования лиц, временно находящихся там, и последующего завоза инфекции из зон ее распространения в различные страны, в том числе в Россию [94, 111].

В национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, Великобритании, США и Канады, возбудитель мелиоидоза включен в список В потенциальных агентов террористических угроз [11], благодаря тому, что мелиоидоз соответствует следующим критериям:

- высокий уровень заболеваемости и смертности, особенно в гиперэндемичных районах распространения инфекции. Так, в Таиланде

B. pseudomallei является причиной 20 % септицемий и приблизительно 40-70 % летальных исходов вследствие бактериального сепсиса [117].

- низкая инфицирующая доза и высокая инфекционность аэрозоля, способная вызывать большие вспышки;
- отсутствие эффективных схем лечения. Лечение острого мелиоидоза требует немедленного назначения чрезвычайно агрессивной антимикробной терапии, и при этом лечение не гарантирует санацию организма или предотвращения рецидива заболевания [66; 100];
- устойчивость в отношении широкого спектра антибиотиков. *B. pseudomallei* устойчив к различным противомикробным препаратам, таким, как пенициллин, ампициллин, цефалоспорин, стрептомицин, гентамицин и полимиксины [156] и обладает способностью выживать и размножаться внутри «профессиональных» и «непрофессиональных» фагоцитов, также он устойчив к клеточным окислительным механизмам уничтожения бактерий [71; 96];
- отсутствие безопасных и эффективных средств специфической профилактики мелиоидоза (вакцин) [52].

В связи с нарастающей угрозой применения террористами микроорганизмов в качестве биологического оружия в ряде ведущих стран были разработаны планы ответных мер в случае биотеррористической атаки.

Так, в 2001 г были опубликованы рекомендации ВОЗ "Ответные меры системы общественного здравоохранения на угрозу применения биологического и химического оружия" [12], в которых подчеркивалась необходимость введения в практику методов обнаружения биологических агентов, основанных на молекулярных технологиях, а также уделялось внимание вопросам повышения чувствительности, скорости и точности методов обнаружения биологических агентов, поднималась проблема создания новых безвредных и эффективных вакцин.

В соответствии с разработанными Международными медико-санитарными правилами 2005 г. и санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации», а также решением

координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств - участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней, мелиоидоз, наряду с другими нозологическими формами инфекционных заболеваний, был назван актуальным заболеванием на территории Российской Федерации (от 3.06.2005 г.). Данное решение делает обязательным проведение таких мероприятий, как эпидемиологический надзор за мелиоидозом, своевременное выявление заносных и подозрительных случаев болезни и проведение ее эпидемиологической диагностики. Принятое законодательство обязывает осуществлять контроль на транспортных средствах и в пунктах пропуска через государственную границу за лицами, прибывшими из эндемичных стран.

В России предпринимаются активные меры противодействия биотерроризму. Так, была создана Межведомственная антитеррористическая комиссия РФ и утверждена Федеральная целевая программа "Создание методов и средств защиты населения и среды обитания от опасных и особо опасных патогенов в чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера на 1999-2005 гг.". В ней определены следующие вопросы, касающиеся в том числе и возбудителя мелиоидоза: фундаментальные исследования патогенов, прогнозирование вспышек инфекционных заболеваний, специфическая индикация и диагностика, профилактика и лечение, защита от патогенов (средства и методы обеззараживания).

Активное участие в области противодействия биотерроризму реализуется в рамках существующей системы противочумных институтов. Основные задачи этой системы заключаются в повышении эффективности эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями, реализация федеральных и региональных программ по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, совершенствование системы вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний; интенсификации научных исследований в области диагностики, эпидемиологии, лечения и профилактики инфекционных заболеваний [41].

В 2008 г. на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в целях обеспечения лабораторной диагностики современного уровня, а также для предупреждения завоза и распространения на территории РФ возбудителей сапа и мелиоидоза приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» создан Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. Данный центр осуществляет научную, консультационно-методическую, диагностическую и экспертную деятельность на территории Российской Федерации по вопросам идентификации и изучения биологических, молекулярно-генетических и биохимических характеристик возбудителей сапа и мелиоидоза. Специалисты Референс-центра осуществляют разработку новых диагностических препаратов и методов лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза; в случае возникновения необходимости, проводят лабораторные исследования материала, подозрительного на наличие возбудителя мелиоидоза; оказывают консультативную помощь органам здравоохранения.

Таким образом, несомненная актуальность изучения возбудителя мелиоидоза, *B. pseudomallei*, экзотического для нашей страны микроорганизма, создает необходимость разработки медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) для его быстрого и эффективного выявления [77, 120].

Для изготовления эффективных иммунодиагностических средств обнаружения возбудителя мелиоидоза важно обладать информацией о том, какой антиген является потенциальной мишенью при проведении этапов лабораторной диагностики. От этого зависит выбор компонентов для соответствующей реакции, направленной на выявление этой мишени. Для достижения такой цели необходимы знания антигенной структуры возбудителя, информация о наличии общих, перекрестнореагирующих и видовых антигенов.

Анализ антигенных структур *B. pseudomallei* и *B. mallei* в разное время был представлен в работах Cravitz и Miller [62]; Chambon и Fournier [56]; Lapeisonie [88]; Fournier [73]; А.К.Адамова, К.С.Карпузиди, М.Ф.Акуловой [1]; Dodin и Fournier [71]; Steinmetz I., Rohde M., Brenneke B. [138]; Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P. с соавт. [132]; Steinmetz I., Nimtz M., Wray V. с соавт. [136]; Пивня Н.Н., Алексеева В.В., Попова С.Ф. и др. [20] и других [63, 79, 121, 127].

На сегодняшний день определены основные детерминанты вирулентности *B. pseudomallei*. Они включают липополисахариды [67], капсульный полисахарид [47; 63, 79, 123], quorum sensing систему [150], систему III типа секреции (транспорт молекул патогенности из цитоплазмы бактерии в цитозоль эукариотической клетки макроорганизма) [153], пили [72] сериновые металлопротеазы [90].

Разнообразные тест-системы для генетического анализа выявили наличие транспозонов мутагенеза и аллельного обмена [68; 103]. С помощью этих тест-систем было оценено участие специфических генов вирулентности *B. pseudomallei*, также выявлены и охарактеризованы различные генетические локусы, связанные с некоторыми детерминантами вирулентности *B. pseudomallei* [68; 122, 124, 140].

Антигены *B. pseudomallei*, ассоциированные с клеткой

B. pseudomallei продуцирует различные клеточно-ассоциированные антигены, в том числе липополисахариды, экзополисахариды, жгутики, пили и поверхностносвязанную кислую фосфатазу.

Липополисахариды (ЛПС)- это макромолекулярные компоненты на внешней мембране грамотрицательных бактерий, состоящие из липидов, терминального (корового) олигосахарида, и О-антигена (О-ПС) [122]. ЛПС играет важную роль в вирулентности грамотрицательных микроорганизмов [110], и в частности для *B. pseudomallei* [121, 127].

Установлено, что этот сложный по составу компонент клеточной стенки высоко консервативен. Известно, что ЛПС *B. pseudomallei* имеет много общего с ЛПС *B. thailandensis*, который не является патогенным для человека. В этой связи

возникает ряд вопросов относительно того, можно ли рассматривать ЛПС в качестве одного из основных самостоятельных факторов вирулентности. Было высказано предположение, что в естественных условиях функции ЛПС молекул могут сильно отличаться [125].

Первоначальные исследования структурных характеристик ЛПС *B. pseudomallei* выявили наличие штаммов с двумя различными О-ПС: О-ПС I и II типа [86; 109]. Тип I О-ПС был переведен в категорию капсульных экзополисахаридов. Тип II О-ПС является неразветвленным гетерополимером с повторяющимися остатками D-глюкозы и L-талозы. О-ПС *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* как было показано, имеют идентичные фрагменты в своей структуре [52; 53; 67]. Установлено, что мутанты *B. pseudomallei*, лишенные О-ПС, были восприимчивы к лизису за счёт бактерицидного воздействия раствора, содержащего 30 % нормальной человеческой сыворотки. Кроме того, мутанты, дефектные по О-ПС, демонстрировали сниженную вирулентность при биологическом моделировании инфекции на животных. В последнее время группа авторов сообщила о наличии О-ПС III типа [126]. Окончательная картина роли полисахаридов в составе ЛПС в проявлении вирулентности *B. pseudomallei* остаётся неясной, так как был обнаружен ещё один предполагаемый кластер полисахарида (тип IV О-ПС) [80].

Важную роль в вирулентности возбудителя мелиоидоза играет капсула. Наличие капсулы в составе микробной клетки коррелирует с вирулентностью у многих видов бактерий, в частности тех, которые вызывают серьезные инвазивные инфекции у человека. Известно, что капсула обладает антифагоцитарными свойствами, защищая микроорганизм от механизмов фагоцитоза и комплемент-зависимого лизиса. Она способствует ослаблению факторов специфического иммунитета хозяина, также капсула обеспечивает присоединение патогена к клетке и последующей её колонизации [79, 112, 121, 127, 130].

Капсулы представляют собой высоко гидратированные полимеры, которые обеспечивают взаимодействие бактерий с их ближайшим окружением. Ранее

сообщалось, что *B. mallei* не продуцирует капсулу, с другой стороны, многочисленные исследования показывают, что *B. mallei* способна образовывать капсулу *in vivo*, которая важна для проявления её вирулентности [25, 66, 122]. Таким образом, капсула патогенных видов *Burkholderia* играет важную роль в защите возбудителей от фагоцитоза и может блокировать бактерицидное действие фагоцитов после интернализации [122].

Обзор фенотипических признаков, которые присутствуют у *B. mallei* и *B. pseudomallei*, но отсутствуют у *B. thailandensis*, может позволить выявить новые детерминанты вирулентности. Капсульный экзополисахарид является одним из кандидатов, который соответствует этим критериям. Гены, кодирующие экзополисахарид капсулы возбудителей сапа и мелиоидоза ещё до конца не установлены также как и его роль в патогенезе заболеваний, вызываемых данными микроорганизмами. Непатогенный микроорганизм *B. thailandensis* также содержит часть капсульного кластера генов. Различия капсульных полисахаридов вирулентных штаммов по сравнению с непатогенными штаммами *Burkholderia* ещё окончательно не выяснены.

Экзополисахариды (ЭПС)

Литературные данные свидетельствуют о том, что в составе микробной клетки *B. pseudomallei* идентифицировали три или четыре структурно различных ЭПС [85; 100; 122].

Steinmetz с соавторами получили МКА (МКА 3015), которые специфически связывались с полисахаридной структурой, отличной от О-ПС [136]. Эти МКА взаимодействовали с экзополисахаридами (ЭПС), экспонированными на капсуле. Молекулярный вес данного ЭПС, по данным авторов, был не менее 150 кДа.

Независимо от этого исследования, Masoud с соавторами, опубликовали данные о структуре ЭПС, выделенного из капсулы *B. pseudomallei* [100]. Ими было установлено наличие ЭПС, связанного с *B. pseudomallei* и отсутствующего у штаммов *B. thailandensis*, что подтверждает роль этого антигена в вирулентности [136].

Существование второй структуры ЭПС у вирулентных *B. pseudomallei* штаммов было доказано двумя независимыми группами учёных под руководством Steinmetz и Kawahara [85; 136]. Полисахаридтипа I О-ПС был переименован в ЭПС капсулы [122]. Этот капсульный ЭПС имеет структуру с молекулярной массой около 200 kDa. Генный кластер, ответственный за биосинтез данного ЭПС, был идентифицирован у *B. pseudomallei*. Штаммы, имеющие мутации в этом кластере генов, обладали гораздо меньшей вирулентностью на модели сирийского золотистого хомячка [122].

Антиген 200 kDa *B. pseudomallei* относится к группе экзополисахаридов грамотрицательных бактерий, так называемых капсульных полисахаридов, - значимых факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза. Он является гликопротеином в составе капсулы, его идентифицируют как составную часть антигена 8, локализованного внеклеточно [20; 21; 23].

В 1982 году сотрудниками ВолгоградНИПЧИ В.В. Илюхиным и Н.Н. Пивнем была разработана принципиальная антигенная схема преципитиногенов *B. pseudomallei*. Схема антигенов *Burkholderia* была предложена на основании иммуноэлектрофоретических исследований водно-солевых экстрактов из ацетон-высушенных микробных клеток. Опытным путём авторы этого исследования установили, что существенную роль при идентификации возбудителя мелиоидоза играют антигены 6, 8 и d. Аг 8 на 90 % состоит из углеводов и на 10 % из белков. Химический анализ Аг6 показал, что он состоит из 70 % углеводов, 16 % белков и 14% липидов.

В результате изучения поверхностных Аг 6 и Аг 8 возбудителя мелиоидоза установлено, что Аг 6 входит в состав наружной мембраны клеточной стенки возбудителя мелиоидоза, в то время как Аг 8 входит в состав капсулы, которую формируют вирулентные штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа, в отличие от авирулентных вариантов [20].

Антиген 8 идентифицирован в составе капсулы обоих патогенных видов *Burkholderia* [22]. Поверхность капсулы наделена выраженными антифагоцитарными и иммуносупрессивными свойствами, тем самым

обеспечивая выживание микроорганизмов в клетках-хозяевах [21; 55]. По мнению Пивень Н.Н., этот антиген является одним из ведущих факторов вирулентности возбудителя мелиоидоза, патогенное действие которого обусловлено его антифагоцитарными свойствами. Было изучено влияние данного антигена на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов лабораторных животных *in vitro* и установлены отличия в характере взаимодействия фагоцитов с микробными клетками штаммов *B. pseudomallei*, синтезирующих Аг 8 и дефектных по синтезу Аг 8 [18].

Эффективное иммунодиагностическое средство должно обладать строгой специфичностью в отношении определяемого микроорганизма. Так, при его конструировании необходимо учитывать наличие общих перекрестнореагирующих антигенных комплексов с возбудителями других инфекционных заболеваний. Разработка препаратов с учетом этих знаний позволит проводить надежную дифференциацию этих микроорганизмов.

Перекрестнореагирующие и общие антигенные комплексы

Важным условием при дифференциации патогенных и условнопатогенных буркхольдерий (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. gladioli*) и других микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri*) является установление их антигенных взаимоотношений, заключающееся в выявлении у них видовых, перекрестнореагирующих и общих антигенных комплексов.

Впервые в 1928 году группа французских ученых доказала наличие перекрестнореагирующих антигенов у возбудителей мелиоидоза и сапа [151]. Позднее различные группы учёных также подтвердили этот факт [93; 32].

Возбудитель сапа, *B. mallei*, является наиболее близким микроорганизмом *B. pseudomallei* по антигенному составу.

B. mallei, как и *B. pseudomallei*, - это аэробная, инкапсулированная, грамотрицательная палочка. Однако, в отличие от *B. pseudomallei*, *B. mallei* неподвижна. В первую очередь данный микроорганизм поражает непарнокопытных, таких как лошади, мулы и ослы. Зараженные животные

встречаются в некоторых частях Европы, Африки, Ближнего Востока, Азии, Южной Америки, Центральной Америки и Турции [55].

Данные о вирулентности *B. mallei* были получены при постановке экспериментов на моделях животных. В настоящее время определены потенциальные факторы вирулентности, такие как полисахарид капсулы, система quorum Sensing, система секреции типа III и сидерофоры [89].

Капсула *B. mallei* идентична по структуре и составу капсуле *B. pseudomallei*. Эксперименты с мутантными по наличию капсулы микроорганизмами показали, что капсула является очень важным фактором вирулентности *B. mallei* [96].

Антигены, родственные антигенам *B. pseudomallei*, обнаружены и у других видов бактерий. Так, Legroux, Blank (1943), Blank, Delage, Martin (1943), а также Д.Т.Ширяев с соавторами (1976) обнаружили родство *P. aeruginosa* с возбудителем мелиоидоза [78; 46; 37]. Антигенное родство было также найдено при исследовании некоторых видов микробов *Achromobacter*, *Aerobacter*, сальмонелл и клебсиелл Fournier и Chambon (1958). В 1970 году Dodin и Fournier обнаружили два общих с возбудителем чумы преципитиногена [71]. Также у *B. serasia* выявлена антигенная связь со всеми исследуемыми буркхольдериями. Возбудитель мелиоидоза также имеет антигенные связи с возбудителем чумы, туляремии и туберкулеза [24].

В 1997 году Brett с соавторами впервые описали *B. pseudomallei*-подобный микроорганизм, названный *B. thailandensis*. Это граммотрицательная палочка, подвижная из-за наличия полярных жгутиков, растет при диапазоне температур от 25 до 42 °C и секретирует схожие с *B. pseudomallei* продукты жизнедеятельности [53; 54; 67]. Профили устойчивости *B. thailandensis* к различным противомикробным средствам схожи с профилями *B. pseudomallei*. Данный микроорганизм выращивают на модифицированной селективной среде Ашдауна, колонии гладкие и блестящей с розовой пигментацией, в то время как *B. pseudomallei* растет в виде грубых и морщинистых колоний с фиолетовой пигментацией. Данный микроорганизм является сапрофитом и обитает во внешней среде юго-восточной Азии. Он имеет сходные морфологические и

биохимические профили с возбудителем мелиоидоза, а также близкое антигенное родство с высоковирулентными патогенами человека и животных *B. pseudomallei* и *B. mallei*, но имеет гораздо меньшую вирулентность по сравнению с ними [118]. Различие заключается и в способности *B. thailandensis* ассимилировать L-арабинозу [78]. Присутствие этого условнопатогенного микроорганизма во внешней среде вносит существенный вклад в формирование серопозитивности у лиц, проживающих на территории Таиланда, по сравнению с Австралией, где *B. thailandensis* не обитает [45]. Некоторые антигены, такие как липополисахарид, известны как консервативные для рода *Burkholderia*, в то время другие - иммунологически уникальны для каждого вида. Кроме того, *B. thailandensis* не экспрессирует, по меньшей мере, два из капсульных полисахаридов, которые продуцирует *B. pseudomallei* [122]. В 2005 году Rachaneeporn Tiyawisutsri с соавторами удалось подобрать группу антигенов, на основе которых *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* были отличимы в РНГА [145]. Однако проблема дифференциации этих двух видов буркхольдерий по-прежнему сохраняет актуальность.

Пивень Н.Н. с соавторами разработали способ выявления перекрестно-реагирующих антигенов возбудителей мелиоидоза, сапа, чумы, туляремии и туберкулеза в SDS-PAGE с одновременным определением их основных физико-химических характеристик, однако он позволял выявлять у них индивидуальные протеиновые антигены, но не дифференцировать их друг от друга [24].

Таким образом, до настоящего момента видоспецифические иммунодиагностические препараты для обнаружения возбудителя мелиоидоза не разработаны и проблема их создания актуальна.

1.2 Современное состояние лабораторной диагностики мелиоидоза

Лабораторная диагностика мелиоидоза включает бактериологический, молекулярно-генетический и иммунологический методы. Эти методы применяют с целью индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза.

Бактериологическое исследование

В зонах эндемичного распространения возбудителя мелиоидоза бактериологический метод является «золотым стандартом». С его помощью подтверждают диагноз мелиоидоза. Преимущества метода - простота и экономичность, а также отсутствие потребности в дорогостоящем оборудовании. Однако длительность проведения бактериологического анализа является ограничением для постановки диагноза на ранних этапах заболевания и принятия решения о назначении эффективной терапии. Так, для выполнения бактериологического исследования в полном объеме требуется не менее 3-4 суток. В случае развития острой формы заболевания в течение 24-48 ч от начала заболевания у большинства пациентов развивается септицемия, требующая немедленного лечения. Таким образом, фактор времени выполнения исследования остаётся ключевым [77, 120, 121].

Молекулярно-генетические методы

В схему лабораторной диагностики мелиоидоза помимо традиционного бактериологического метода, направленного на выделение чистой культуры возбудителя, входят молекулярно-генетические методы, в первую очередь, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод используют как для экспресс-диагностики при исследовании биологического материала, так и для специфической индикации возбудителя мелиоидоза в объектах окружающей среды в качестве ускоренного предварительного теста. Также ПЦР используют для выявления генетических маркеров вирулентности и патогенности возбудителя мелиоидоза и его антибиотикоустойчивости [35].

Помимо ПЦР, генотипирование штаммов возбудителя мелиоидоза можно проводить с помощью пульс-электрофореза, амплификации с произвольными праймерами, мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), метода, основанного на анализе переменных ампликонов (VAT), и метода мультилокусного анализа переменности tandemных повторов (MLVA) [6, 124, 140].

Иммунологические методы

В общей схеме лабораторной диагностики мелиоидоза иммунодиагностические тесты занимают значимое место. По сравнению с бактериологическим методом, время анализа значительно сокращается, но появляется потребность в высокоспецифичных реагентах.

При возникновении чрезвычайной ситуации, обусловленной применением возбудителя опасного инфекционного заболевания в качестве ПБА, сотрудники лабораторной службы должны своевременно его обнаружить и идентифицировать. Необходимо выполнить ряд исследований, направленных как на выявление возбудителя, так и на обнаружение специфических антител в крови больных. От оперативности работы лабораторной службы зависит скорость постановки правильного диагноза мелиоидоза и начала своевременного лечения [133, 131].

Ряд иммунологических методов обнаружения *B. pseudomallei* были внедрены в практику как для обнаружения антител, так и антигенов возбудителя мелиоидоза в клинических образцах. Многие из них, такие как РНГА, просты в исполнении и не требуют наличия дорогостоящего оборудования, однако они имеют недостаточную чувствительность обнаружения данного патогена.

Обнаружение антител (серодиагностика)

Выявление специфических антител в сыворотке людей, подозрительных на заболевание мелиоидозом, осуществляется с помощью ряда тестов, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [133; 160, 131, 135].

Ведущими специалистами всего мира наиболее информативными иммунодиагностическими тестами, пригодными для использования в практических лабораториях, признаны реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ).

В регионах эндемичного распространения *B. pseudomallei* для сероэпидемиологического мониторинга используют РНГА с диагностикумами эритроцитарными антигенными, приготовленными на основе различных антигенов данного микроорганизма [75; 115, 135].

В этих районах интерпретация результатов иммунологических методов, направленных на обнаружение специфических АТ, имеет некоторые сложности, заключающиеся в невозможности выявления субклинических форм заболевания у внешне здоровых людей, проживающих в этих областях. Вероятно, серопозитивность обусловлена наличием антител к другим грамотрицательным микроорганизмам [66]. Так, в Малайзии при исследовании 200 доноров у 53 из них были выявлены антитела к *B. pseudomallei* [106]. Наличие фоновых антител создает трудности при постановке правильного диагноза и является одним из основных ограничений при корректной расшифровке результатов РНГА.

Несмотря на богатый опыт по постановке РНГА с целью поиска АТ к возбудителю мелиоидоза при оценке результатов реакции, нет единой точки зрения по поводу диагностического титра антител у лиц, инфицированных *B. pseudomallei*, перенесших это заболевание или временно находившихся в зонах распространения инфекции. Даже при наличии перечисленных недостатков РНГА, данный тест востребован в регионах эндемичного распространения *B. pseudomallei* благодаря своей низкой стоимости, простоте в исполнении и времени выдачи ответа.

В нашей стране для серодиагностики мелиоидоза и сапа существует один препарат «Диагностикум эритроцитарный для выявления антител к возбудителям мелиоидоза и сапа антигенный жидкий», разработанный сотрудниками ФГУ «48 ЦНИИ МО» (Киров).

Более чувствительным методом для поиска антител к возбудителю мелиоидоза является ТИФМ. Тест-системы подобного целевого назначения стали создавать в конце 20 века. Главным условием для разработки чувствительного и специфичного метода является подбор твердой фазы и антигена, сорбируемого на ней, который обеспечивает эффективное обнаружение антител в условиях эндемичных и неэндемичных зон распространения возбудителя мелиоидоза.

Несмотря на большой объем проведенных исследований с использованием экзотоксина, ЛПС, белков, фрагментов капсулы, оптимальный антиген в качестве

лиганда на твердой фазе, до сих пор не оценен в широкомасштабных испытаниях с точки зрения клинической значимости.

Сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора было установлено, что для разработки тест-системы иммуноферментной мелиоидозной, предназначенной для обнаружения антител, наиболее целесообразно использовать антигены 6 и 8 [17; 15]. Данные антигены были выделены с помощью метода аффинной хроматографии на моноклональных иммуносорбентах. За рубежом аналогичным методом был получен поверхностный экзополисахарид с молекулярной массой более 150 kDa в непрямом варианте ТИФМ при обнаружении антител к *B. pseudomallei*. Тест-система на его основе хорошо себя зарекомендовала в условиях эндемичного региона при работе с пробами клинического материала, в связи с чем данный антиген представляет интерес для конструирования на его основе иммунодиагностических препаратов и тест-систем [69].

Обнаружение микробных клеток *B. pseudomallei*

Несмотря на то, что «золотым стандартом» для постановки правильного диагноза при мелиоидозной инфекции является бактериологическое выделение чистой культуры и её идентификация, МФА по-прежнему остается одним из основных иммунодиагностических тестов быстрого обнаружения *B. pseudomallei* в пробах из различных объектов внешней среды [7].

МФА позволяет установить органный, тканевую и клеточную локализацию исследуемого антигена. Следует учитывать, что этот метод требует профессиональной подготовки врача-исследователя. Для воспроизведения метода в условиях повседневной работы или в случаях возникновения чрезвычайных ситуаций лаборатории должны располагать препаратами иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих для обнаружения тех или иных микроорганизмов. Большое влияние на специфичность и чувствительность метода оказывает качество диагностических препаратов.

Исследования по разработке иммунодиагностических препаратов для МФА были начаты в Волгоградском научно-исследовательском противочумном

институте в начале 70-х годов. За период 1972-1987 г.г. были изготовлены и апробированы целый ряд препаратов, основой которых являлось поликлональное сырье - иммуноглобулины гипериммунных мелиоидозных сывороток экспериментальных животных [3]. Поликлональное сырье, на основе которого были приготовлены диагностические препараты, имело ограничения по объему, также качество получаемых серий антител при иммунизации биопродукторов сырья для изготовления препаратов было различным.

Переход на моноклональное сырье позволил избежать этих недостатков. В итоге были получены чувствительные и специфичные коммерческие препараты, хорошо зарекомендовавшие себя в испытаниях разного уровня: иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сапные моноклональные мышинные сухие, иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные мышинные сухие. Данные препараты предназначены для обнаружения и идентификации возбудителя сапа и мелиоидоза, соответственно, в нативных пробах с объектов внешней среды (воздух, вода, смывы с различных поверхностей), а также пробах материала от больных (здоровых) людей, животных.

ТИФМ для обнаружения возбудителя мелиоидоза

В последнее время все большее значение для поиска антигена возбудителя мелиоидоза в различных пробах приобретает ТИФМ. Данный метод – один из наиболее чувствительных иммунодиагностических тестов обнаружения данного патогена. Он позволяет выявлять как микробные клетки, так и растворимые антигены этого патогена. По чувствительности ТИФМ в 10-20 раз превосходит метод флуоресцирующих антител, в 30 раз – реакцию непрямой гемагглютинации [6; 32].

Ранее в институте была разработана технология изготовления тест-системы иммуноферментной для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза, в которой в качестве антител первого порядка, адсорбируемых на твердой фазе, и антител второго порядка использовали поликлональные иммуноглобулины гипериммунных мелиоидозных сывороток лабораторных животных. Тест-система

была предназначена для обнаружения возбудителей мелиоидоза и сапа в пробах с различных объектов исследования. При постановке реакций со взвесями чистых культур различных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* эта диагностическая иммуноферментная тест-система обеспечивала чувствительность метода в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^3$ - $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. При использовании этой тест-системы для исследования проб с объектов внешней среды чувствительность метода колеблется от $1 \cdot 10^4$ м.к./мл и более в зависимости от степени контаминации материала посторонней микрофлорой и частицами пыли.

По мере внедрения в практику лабораторного анализа МКА, в том числе и МКА к различным антигенам возбудителя мелиоидоза, накоплены данные об экспериментальных вариантах тест-системы [39]. В то же время коммерческие диагностические иммуноферментные тест-системы для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза на внутреннем и международном рынке МИБП отсутствуют.

Использование МКА для изготовления иммунодиагностических средств

Традиционная схема лабораторного анализа на этапах индикации и идентификации возбудителя мелиоидоза может быть дополнена диагностическими средствами, изготовленными на основе МКА к антигенам *B. pseudomallei*.

В последние годы для создания диагностических средств стали использовать моноклональные антитела (МКА). Применение моноклональных антител в диагностике позволяет значительно увеличить специфичность и чувствительность тест-систем. Использование МКА в различных видах иммуноанализа доказало их наибольшую пригодность для диагностики.

Моноклональные антитела позволили решить такую важную проблему, как наличие постоянного источника больших количеств гомогенных по составу и свойствам антител, являющихся сырьём для изготовления иммунодиагностических средств на их основе. МКА, как компоненты диагностических тест-систем, являются наиболее точным инструментом

исследований. Они позволяют получить подробную информацию о местоположении и структуре антигенных детерминант, антигенном дрейфе, эпитопной плотности диагностически значимых биополимеров [28].

Высокая эффективность МКА в различных реакциях подтверждена экспериментально. Особенно следует отметить работы по получению МКА к антигенам особо опасных инфекций: туляремии [33], бруцеллеза [37], сибирской язвы [38], холеры [34] и чумы [36].

С того времени, как гибридомную технологию стали использовать для получения высокоактивных иммуноглобулиновых моноклональных ингредиентов заданной специфичности для применения в диагностических тест-системах стало возможным усовершенствование таких методов, как ТИФМ, направленного на обнаружение возбудителей патогенных буркхольдерий, *B. pseudomallei* и *B. mallei* [43].

В диагностических целях чаще всего применяют МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* [138] или поверхностно локализованному антигену капсулоподобного вещества [125], окружающего клетку *B. pseudomallei*, конструируя на их основе препараты и тест-системы для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов.

О возможности использования МКА к эпитопам экзотоксина, одного из наиболее важных факторов вирулентности *B. pseudomallei*, в качестве основного компонента высокочувствительной иммуноферментной тест-системы впервые сообщили Ismail с соавторами в 1987 году. Группа учёных опубликовала информацию о высокой разрешающей способности иммуноферментной тест-системы на основе МКА в плане обнаружения экзотоксина в сыворотке крови экспериментальных животных [82]. Этот тест позволял обнаруживать в культуральной среде до 16 нг/мл токсина. Однако его никогда не использовали в реальных клинических. Позднее в 1990 году Wongratanacheewin с соавторами предложили авидин-биотиновую систему на основе поликлональных АТ, способную определять до 4 нг/мл АГ возбудителя мелиоидоза. Основной

компонент, выявляемый данной тест-системой, - белок с м.м. 40 kDa. Данный тест также не был внедрён в практику [157].

В 1994 году Desakorn с соавторами разработали тест-систему для обнаружения ЛПС возбудителя мелиоидоза в моче больных с системным или локализованным мелиоидозом. Данная система представляет собой сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного метода с применением МКА. С помощью этой тест-системы удавалось выявлять ЛПС *B. pseudomallei* в концентрации 12,2 нг/мл. Этот сэндвич вариант ТИФМ оказался высокоэффективным при обнаружении антигенов в пробах различного клинического материала, включая гной, мокроту, мочу и плевральную жидкость. Чувствительность и специфичность теста была равна 75 % и 98 % соответственно.

Эффективность применения МКА для обнаружения возбудителя мелиоидоза и дифференциации близкородственных видов буркхольдерий подтверждена работами отечественных учёных [10; 3; 42].

В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте в 1996-1998 гг. на основе МКА была разработана и апробирована экспериментальная иммуноферментная тест-система для выявления гликопротеина (Ag8) *B. pseudomallei*. С помощью этой тест-системы была подтверждена гетерогенность штаммов *B. pseudomallei* по признаку экспрессии антигенных детерминант, в частности по содержанию Ag8 в суточных культурах буркхольдерий [29].

Одним из актуальных направлений в совершенствовании лабораторной диагностики мелиоидоза является дифференциация вирулентных и авирулентных штаммов *B. pseudomallei*, выделяемых из проб клинического материала и объектов внешней среды соответственно.

Возможность дифференции штаммов возбудителя мелиоидоза на этом уровне впервые была показана Wuthiekanum и Smith с соавторами в 1996 и 1997 гг. соответственно. Они установили, что авирулентные штаммы возбудителя

мелиоидоза, изолированные из внешней среды, отличаются от вирулентных клинических изолятов по способности ассимилировать L-арабинозу [159; 134].

Позднее Sirisinha с соавторами (1998) после получения МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* и их применения для диагностики мелиоидоза показали возможность дифференциации вирулентных (Ara-) и авирулентных (Ara+) штаммов возбудителя мелиоидоза по наличию или отсутствию гликопротеина с м.м. 200 kDa на поверхности данного микроорганизма [132]. Данный факт был подтвержден Steinmetz с соавторами в 1999 году при работе в эндемичных районах по мелиоидозу [137].

С 2000 г среди учёных общепринятым считается тот факт, что авирулентные Ara+ *B. pseudomallei* изоляты из внешней среды отличаются от вирулентных Ara- клинических изолятов и изолятов из внешней среды способностью ассимилировать L-арабинозу и отсутствием гликопротеина с м.м. 200 kDa на поверхности данного микроорганизма [44].

Таким образом, одним из перспективных направлений дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики мелиоидоза является разработка иммунодиагностических препаратов и тест-систем на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* (гликопротеин в составе капсулы), предназначенных для обнаружения и идентификации вирулентных штаммов *B.pseudomallei*.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы микроорганизмов

В работе было использовано 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*.

Культивирование буркхольдерий осуществляли на плотных и жидких питательных средах с добавлением 5 % глицерина, pH 6,8, при 37 °C в течение 1-2 сут. Гетерологичные виды микроорганизмов культивировали с учетом их питательных потребностей и оптимальных режимов выращивания [27].

Все этапы работы с живыми культурами различных штаммов *B. pseudomallei* и близкородственных микроорганизмов, обеззараживание их бактериальных взвесей, проверку этих объектов на стерильность проводили в специализированных боксах биобезопасности с соблюдением всех требований режима работы [30;31].

2.2 Клеточные линии

В процессе работы использовали гибридомы-продуценты МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*. Коллекция получена в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-

исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и находится на постоянном хранении в биохранилище с жидким азотом при минус 196 °С.

2.3 Экспериментальные животные

Лабораторных животных получали из питомника ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Инбредных белых мышей линии BALB/c использовали на этапе накопления моноклональных антител *in vivo*, а также для приготовления подкормочного (фидерного) слоя клеток, применяемого на этапе культивирования гибридом *in vitro* после их выведения из криоконсервированного состояния.

Условия содержания лабораторных животных полностью соответствовали нормативам, представленным в документе «Санитарные правила устройства, оборудования и содержания экспериментально-биологических клиник (вивариев) № 1045—73 Минздрав СССР».

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с этическими нормами, изложенными в «Международном кодексе медицинской этики» (1994), Хельсинской декларации (2000) и Директивах Европейского сообщества 86/609ЕЕС.

2.4 Питательные среды

Основной средой выращивания гибридных клеток-продуцентов моноклональных иммуноглобулинов *in vitro* являлась жидкая питательная среда RPMI-1640 производства Федерального государственного унитарного

«Предприятия по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН», Россия.

В среду RPMI-1640 дополнительно вносили расчетные количества стерильных растворов пирувата натрия (4 mM), антибиотиков (пенициллин - 100 ЕД/мл, стрептомицин - 100 мкг/мл, тилозин - 10 мкг/мл). Эту среду использовали в качестве основы для приготовления:

1) среды для фидерных клеток (основная среда + 10 % эмбриональной телячьей сыворотки),

2) среды для культивирования гибридом (основная среда + 15 % ЭТС).

Непосредственно перед работой в среды № 1 и № 2 вносили L-глутамин (2 mM).

2.5 Антигены

В качестве антигенов применяли взвеси клеток возбудителей сапа и мелиоидоза, обеззараженные физическими и химическими методами стерилизации (ацетоном, 4 % формалином, автоклавированием при 1,5 атм, прогреванием при 100 °C в течение 30 мин). Обеззараженные взвеси клеток проверяли на стерильность в соответствии с «Инструкцией по проведению контроля на специфическую стерильность препаратов, приготовленных из объектов, содержащих культуры возбудителей сапа и мелиоидоза» [4], после чего использовали для приготовления образцов антигенов.

Для приготовления водно-солевого экстракта к 1 г сухой бакмассы обеззараженных ацетоном клеток буркхольдерий или других микроорганизмов добавляли 60 мл 0,9 % раствора NaCl, pH 7,0 - 7,2. Взвесь бактерий помещали на

магнитную мешалку на сутки, затем восстановленные клетки обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин при мощности 150 Вт и частоте 20 кГц.

Разрушенные фрагменты клеток отделяли центрифугированием при 16000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость, содержащую смесь растворимых антигенов того микроорганизма, с которым была проведена манипуляция, отделяли, определяли концентрацию белка в этом образце ВСЭ, разливали в ампулы по 0,5 мл и хранили при минус 20 °С. Полученные ВСЭ использовали в качестве объектов исследования в различных иммунодиагностических тестах с целью выявления в них антигена-мишени.

При получении гликопротеина *B. pseudomallei* источником выделения гликопротеина капсульного вещества возбудителя мелиоидоза являлись обеззараженные ацетоном и высушенные клетки штамма *B. pseudomallei* 100. Данный штамм возбудителя мелиоидоза был выбран в связи с тем, что он обладает высокой вирулентностью.

Экстракцию гликопротеина из клеток *B. pseudomallei* 100 осуществляли формамидом по методу Фуллера в модификации Пивня Н.Н., заключающейся в изменении температурного режима экстрагирования биополимера. Авторами было установлено, что этап экстрагирования необходимо проводить при более мягких температурных условиях (экстракция при 20 °С, вместо 150 °С, рекомендованных Фуллером) [19]. Серия 17 формамидного экстракта *B. pseudomallei* 100 была выбрана в качестве контрольного антигена на всех этапах работы. Формамидные экстракты использовали в ТИФМ в качестве лиганда для адсорбции на твердой фазе на этапе скрининга моноклональных антител и оценки активности МКА, выделенных из среды культивирования и асцитической жидкости.

Экстрацеллюлярные экстракты (ЭЦА) получали при выращивании культур на 1,5 % МПА, покрытом целлофановой пленкой. С помощью расплавленного агара формировали слой среды в 3 см в стерилизаторах объемом 2 л. После

образования геля поверхность агара накрывали стерильным целлофаном. Посев проводили односуточной бульонной культурой, которую пипеткой наносили на поверхность целлофана и шпателем равномерно распределяли по всей поверхности. Инкубировали при 32 °С и 37 °С в течение 1, 2 и 8 сут. Затем осуществляли смыв бакмассы с поверхности целлофана с использованием 0,9 % раствора NaCl с добавлением мертиолята натрия 1:10000. Полученный смыв культуры подвергали либо фильтрации на стерилизующих фильтрах, либо центрифугированию с последующей фильтрацией супернатанта. Фильтрат после проверки на стерильность концентрировали и диализовали на мембране РМ-10.

2.6 Методы биохимического анализа антигенов

Во всех образцах антигенных препаратов определяли содержание белка с помощью спектрофотометра СФ-46 и по методу Лоури [113], а также полисахаридов по методу Дюбо [132].

2.7 Размораживание гибридом-продуцентов МКА

Для накопления различных вариантов МКА *in vitro* или *in vivo* ампулу с клетками соответствующей гибридомы размораживали.

Последовательность проведения этапа размораживания была следующей:

- 1) подготовка и маркировка центрифужных пробирок с бессывороточной средой (по 8-10 мл);
- 2) размораживание ампул с клетками на водяной бане при 37 °С в течение 1-2 мин;

3) перенос взвеси размороженных клеток и их медленное наслаивание на бессывороточную среду;

4) центрифугирование образцов при 1000 об/мин в течение 10 мин для освобождения от компонентов защитной среды;

5) удаление супернатанта, ресуспендирование осадка в 1,0 мл полной среды культивирования, отбор 0,1 мл взвеси для последующего подсчета процента жизнеспособных клеток, вынос оставшейся части на фидер в лунки 24-луночной пластины;

6) подсчет числа жизнеспособных клеток в приготовленных взвесях осуществляли по методу прижизненной окраски трипановым синим [5]. Для этого в пробирку с 0,1 мл взвеси клеток вносили равный объем 0,4 % раствора трипанового синего (Sigma-Aldrich, США). Сразу после перемешивания производили подсчет живых (не окрашены) и мертвых (окрашены в темно - синий цвет) клеток в камере Горяева. Производили расчет относительного показателя (%) жизнеспособных клеток.

Гибридомы-продуценты МКА, выведенные из криоконсервированного состояния, выносили на заранее приготовленный слой подкормочных (фидерных) клеток. В качестве фидера использовали макрофаги перитонеального смыва с брюшной полости мышей линии BALB/с. На этапе размораживания гибридом фидер разносили по 0,7 мл в лунки 24-луночной пластины для культивирования клеточных линий. В каждой лунке содержалось $2 \cdot 10^4$ перитонеальных макрофагов.

Вынесенные в лунки 24-луночной пластины с фидером клетки ежедневно просматривали в инвертированном микроскопе, оценивая состояние клеток и темпы их роста. По мере роста и тиражирования клеток гибридом-продуцентов МКА производили перенос части клеток в лунки больших объемов. Тестирование культуральной среды из лунок с растущими гибридомами начинали через 3-4 сут после размораживания, контролируя антителопродукцию с помощью ТИФМ.

Смену среды культивирования (половину объема) также производили через каждые 3-4 сут.

2.8 Реклонирование гибридом-продуцентов МКА

Реклонирование проводили методом предельных разведений. За сутки до клонирования готовили фидер в индивидуальных 96-луночных пластинах для каждого клона-продуцента МКА. В каждую лунку вносили по 0,1 мл взвеси клеток из расчета $6 \cdot 10^4$ спленоцитов или $4 \cdot 10^4$ макрофагов на лунку. Клеток перитонеального смыва, получаемых от 1 мыши, достаточно для одного 96-луночного планшета, спленоцитов из 1 селезенки - для 5-8 планшетов.

Каждую пластину делили на три сектора для выноса в каждую лунку по 25 клеток, 5 клеток и 1 клетке. Готовили необходимые разведения, по 4,0 мл каждого разведения. Затем по 0,1 мл взвеси гибридных клеток вносили в лунки соответствующих секторов.

Пластины помещали в CO_2 -инкубатор (37°C , CO_2 от 5 % до 7 %). В последующие дни осуществляли ежедневный просмотр содержимого лунок, оценивая состояние клеток и отсутствие контаминации. Смену среды производили каждые 3-4 суток, обновляя половину объема.

В течение месяца отслеживали появление в индивидуальных лунках моноклонов. Тестирование среды выращивания с помощью ТИФМ для оценки интенсивности антителопродукции проводили с образцами среды из лунок. Сравнительный анализ выявляемых в ТИФМ титров МКА и оценка темпов роста клонов являлись основанием для отбора субкультур с наилучшими показателями для последующего их тиражирования *in vitro* и *in vivo* с целью накопления препаративных количеств моноклональных иммуноглобулинов, продуцируемых изучаемыми гибридами.

2.9 Накопление моноклональных антител в препаративных количествах

Все этапы работы по накоплению МКА различной эпитопной направленности и их характеристике производили согласно протоколу, разработанному в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*. Рассмотрены Ученым советом и утверждены директором института 28.04.2008 г., протокол № 4).

Для приготовления препаративных количеств МКА клетки гибридом, стабильно продуцирующих специфические иммуноглобулины, тиражировали *in vitro* в чашках Петри или культуральных матрасах (150, 250, 500 мл). Затем по $5 \cdot 10^6$ клеток гибридомы вводили внутрибрюшинно мышам BALB/c, которые за 5-7 сут до этого получили внутрибрюшинную инъекцию pristana или неполного адьюванта Фрейнда (по 0,4 или 0,5 мл). Накопление асцитической жидкости наблюдали через 10 сут и более. На высоте асцитобразования жидкость собирали и центрифугировали для удаления клеточных элементов. Индивидуальные образцы АЖ тестировали в ТИФМ. Пробы одноименных АЖ с одинаковыми значениями титров МКА объединяли.

2.10 Тест-система для скрининга МКА

Присутствие МКА в среде выращивания гибридом контролировали с помощью непрямого варианта ТИФМ: антиген + исследуемый образец + антивидовой иммунопероксидазный конъюгат + субстратная смесь + стоп-реагент.

На твердой фазе (пластинах Costar medium binding для иммуно-ферментного анализа, Corning, США) адсорбировали антиген 200 kDa *B. pseudomallei* 100, разведенный на 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5, до концентрации 10 мкг/мл (по белку). В работе использовали разные серии антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100, предварительно подбирая для каждой из них оптимальную сенсibiliзирующую концентрацию. В лунки пластины вносили по 100 мкл раствора антигена, затем пластину помещали в бытовой холодильник (от плюс 4 до плюс 8 °С) на 16-18 ч. Утром ее трижды отмывали фосфатно-солевым раствором с 0,05 % твина 20. Свободные участки поверхности пластика блокировали 1 % БСА, разведенном на КББ, в течение 30 мин при 37 °С. По истечении этого срока пластины вновь трижды отмывали от несвязавшихся компонентов реакции. На всех этапах реакции объем последовательно вносимых в лунки ингредиентов составлял 100 мкл.

В подготовленных для работы пластинах, нагруженных антигеном, титровали исследуемые образцы культуральной среды (1:10, 1:20, 1:40 и т.д.), разведенные в фосфатно-солевом растворе с твином 20. Время контакта антигена и искомых антител составляло 1 ч при 37 °С. После очередного отмывания пластин в них вносили антивидовой иммунопероксидазный конъюгат в рабочем разведении для выявления комплекса антиген-антитело. Пластины инкубировали при 37° С в течение 1 ч, отмывали несвязавшиеся компоненты реакции и на заключительном этапе для выявления ферментной метки в пластины вносили субстратную смесь: ортофенилендиамин, разведенный в 0,15 М натрий-цитратном буфере, pH 5,0, в раствор которого непосредственно перед применением добавляли перекись водорода до концентрации 0,006 %. Через 15-20 мин реакцию останавливали с помощью стоп-реагента (2,5 М HCl – по 25 мкл в лунку или 1 М HCl – по 100 мкл в лунку). Интенсивность изменения цвета реагентной смеси коррелировала с концентрацией иммуноглобулинов в исследуемом образце.

Контролями реакции служили:

- Реакция с заведомо положительным образцом МКА (K+).
- Контроль неспецифической сорбции конъюгата: в сенсibilизированные лунки вносили только рабочее разведение ИПК и проявляли субстратом (отрицательный контроль КК).
- Контроль субстрата: в сенсibilизированные лунки вносили только рабочий раствор субстратной смеси, при этом содержимое лунки должно оставаться неизменным (отрицательный контроль КС).

Результаты реакции регистрировали на приборе Sunrise™ (Tecan, Австрия) при длине волны 492 нм. При учете результатов реакции на ридере по показателю оптической плотности положительному значению соответствовали значения, превышающие ОП контроля конъюгата не менее чем в 2 раза.

Все этапы постановки реакции выполняли согласно общепринятой практике.

В работе использовали коммерческий антивидовой конъюгат производства ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России: Антитела диагностические против IgG (H+L) белой мыши, меченные пероксидазой, сухие.

2.11 Метод очистки моноклональных иммуноглобулинов

Моноклональные иммуноглобулины из мышинных АЖ выделяли методом трехкратного переосаждения белка сульфатом аммония. Культуральные супернатанты и асциты мышей обрабатывали раствором сульфата аммония (50 % насыщения) одно- и трехкратно соответственно. Осадок иммуноглобулинов отделяли центрифугированием при 16000 об/мин в течение 20 мин, разводили в дистиллированной воде и диализовали против 0,9 % NaCl. Концентрацию белка

определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Активность каждой серии МКА определяли в ТИФМ. Полученные образцы МКА стерилизовали методом мембранной фильтрации (0,45μ), ампулировали и хранили при минус 20 °С до момента их использования.

2.12 Методы контроля серологической активности антител

Специфическую активность моноклональных иммуноглобулинов контролировали с помощью непрямого варианта ТИФМ. В качестве отрицательного контрольного образца использовали иммуноглобулины, изолированные из сыворотки интактных мышей.

Для подтверждения взаимодействия полученных образцов МКА с эпитопами, локализованными на поверхности микробных клеток *B. pseudomallei* 100, применяли НМФА.

Видовую принадлежность и гомогенность приготовленных образцов МКА контролировали с помощью реакции двойной иммунодиффузии в геле с иммунной кроличьей сывороткой против иммуноглобулинов мыши.

Для выполнения реакции двойной иммунодиффузии в геле использовали агар Difco (15 г), расплавленный в 100 мл забуференного 0,9 % раствора NaCl, pH 7,2. Агар разливали порциями по 25 мл в чашки Петри. Через сутки после его застывания и формирования плотного слоя геля чашки были готовы к употреблению. В слое агара с помощью стандартного перфоратора делали лунки для внесения в них МКА и исследуемых антигенных препаратов. Расстояние между лунками составляло 4-5 мм. Объем ингредиентов в каждой лунке не превышал 30-35 мкл. После внесения ингредиентов чашки помещали во влажную камеру.

Результаты РИД оценивали через 24-48 ч по наличию или отсутствию между лунками с образцами компонентов реакции линий преципитата. Положительный результат РИД свидетельствовал об образовании иммунных комплексов (АГ+гомологичные МКА).

2.13 Изотипирование МКА

МКА были протестированы на принадлежность к различным классам иммуноглобулинов с помощью набора реагентов фирмы SIGMA согласно методике, предложенной производителем набора (Antigen-mediated ELISA).

2.14 Изучение конкурентных взаимоотношений пар МКА

Данные о конкурентных взаимоотношениях МКА были получены с помощью методики определения индексов аддитивности различных пар МКА, предложенной Friguet B. с соавторами [75].

2.15 Определение аффинности МКА

Аффинность МКА в отношении контрольного АГ определяли по методике, предложенной Beatty J.D. [48].

2.16 Методы иммунохимического анализа

2.16.1 Характеристика антигенных комплексов вертикальным электрофорезом

Антигенные препараты анализировали в системе вертикального электрофореза в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) по U. K. Laemmli [88], а также использовали нативный гель-электрофорез по Ornstein. L и Davis B.J. без додецилсульфата натрия [109]. Электрофоретической ячейкой служил прибор «Mini-PROTEAN 3» производства «Bio-Rad Laboratories, inc.». В качестве разделяющего слоя использовали 0,75 мм 12 % полиакриламидный гель с добавлением 0,1 % додецилсульфата натрия, а в качестве концентрирующего слоя – 5 % полиакриламидный гель с 0,1 % додецилсульфатом натрия. Режим и условия электрофореза: 50 мА и 200 В в концентрирующем геле, 150 мА и 300 В при прохождении проб в разделяющем геле. Для контроля скорости фракционирования в образцы вносили бромфеноловый синий. В качестве стандартов молекулярных масс использовали наборы маркерных белков 14,4-97 kDa (ООО «Хеликон», Москва).

2.16.2 Обработка гелей после SDS-PAGE на выявление общего, белкового и гликопротеинового антигенного профиля

Для окрашивания белковых фракций применяли спиртово-водные растворы Coomassie R-250 [86], а для выявления общего антигенного профиля использовали коммерческий набор нитрата серебра «Silver Staining Kit Protein»[©] («GE Healthcare», Швеция).

Дифференциальное окрашивание гелей на выявление гликопротеинов проводили по модифицированной методике Zacchrius R.M. и др. с применением йодной кислоты и реактива Шиффа [129] и метод окрашивания гелей алциановым синим [156].

2.16.3 Dot-иммуноанализ

Определение рабочего разведения и отбор МКА для последующего иммуноблоттинга производили с помощью прямого варианта dot-иммуноанализа с экспериментальными ИПК по стандартной методике [50].

2.16.4 Определение эпитопной направленности МКА с помощью иммуноблоттинга

Электрофорез образцов в SDS-PAGE и перенос на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 μm проводили в ячейке прибора «Mini-Trans-Blot» фирмы «Bio-Rad Laboratories, inc.» (США). Перенос осуществляли в жидкой среде при условиях 90 мА и 30 В в течение ночи при 4 °С по Н. Towbin [148] в модификации, которая заключалась в использовании в качестве блокирующего реагента 0,03 % раствора твин-20. Детекцию антигенных препаратов проводили с использованием ИПК, полученных на основе экспериментальных МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*. Обработку мембраны иммуноферментным конъюгатом и последующую визуализацию осуществляли по методике, предложенной V. Tsang [149] с использованием хромогена диаминобензидина, активированного 0,1 мл 3,5 % H_2O_2 .

2.16.5 Методы обработки данных

Электрофореграммы и иммунограммы сканировали в приборе «Epson expression™ 10000 XL» («Epson»). Полученные изображения анализировали с помощью компьютерной программы «TotalLab TL120»[©] («TotalLab Ltd.») с установлением м.м. биополимерных фракций и их математического выравнивания.

2.17 Получение экспериментальных образцов МКА, меченных флуорохромом

Для оценки перспектив использования МКА различной эпитопной направленности против *B. pseudomallei* в качестве основы диагностических препаратов для МФА готовили экспериментальные образцы иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных. Конъюгирование иммуноглобулинов с флуорохромом осуществляли в соответствии с рекомендациями J.W. Goding с соавт. [78].

Нагрузка ФИТЦ на 1 г белка составляла 25 мг. По 3-4 мл каждого образца иммуноглобулинов с концентрацией 20-25 мг/мл переносили в индивидуальные стеклянные стаканчики, которые помещали на магнитные мешалки. Конъюгирование МКА с флуорохромом проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании смеси в течение первого получаса и в состоянии покоя в течение двух часов, рН среды контролировали в процессе конъюгации, не допуская превышения значений более 9,0. Время конъюгирования МКА с ФИТЦ - 2,5 ч при комнатной температуре. Флуорохром вносили в течение 30 мин. Обязательным условием являлось предохранение образцов от дневного света.

Очистку конъюгата от немеченого белка и несвязавшегося красителя проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25, используя для элюирования 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,2.

Расчет показателей концентрации белка и молярного соотношения $M_{\text{ФИТЦ}}/M_{\text{белок}}$ в готовом препарате проводили по формулам 1 и 2 [144].

$$M_{\text{ФИТЦ}}/M_{\text{белок}} = \frac{2,87 \cdot ОП_{495}}{ОП_{280} - (0,35 - ОП_{495})} \quad (1)$$

$$\text{Концентрация белка (мг/мл)} = \frac{ОП_{280} - (0,35 - ОП_{495})}{1,4}, \quad (2)$$

где $ОП_{280}$, $ОП_{495}$ - показатели оптической плотности при длине волны 280 и 495 нм соответственно.

Готовый конъюгат ампулировали, лиофилизировали или хранили при минус 20 °С.

Свойства меченных ФИТЦ иммуноглобулинов оценивали по результатам МФА, который проводили общепринятым способом с использованием фиксированных мазков-препаратов микробных клеток штамма *B. pseudomallei* 100, приготовленных из бактериальной взвеси с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл.

На поверхность стекла с фиксированными и обеззараженными мазками-препаратами, помещенного во влажную камеру, пипеткой наносили по каплям (по 30 мкл) меченных флуорохромом иммуноглобулинов в разведениях: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64. После нанесения исследуемых образцов конъюгатов влажную камеру со стеклом накрывали светонепроницаемой крышкой.

Через 20 мин инкубации при комнатной температуре стекла дважды промывали 0,9 % раствором натрия хлорида, по 5-10 мин, ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Люминесцентную микроскопию мазков проводили на люминесцентном микроскопе МИКМЕД-2, вариант комплектации 11 (изготовитель ОАО «ЛОМО», Санкт-Петербург) с использованием иммерсионных объективов, светофильтров возбуждающего света СЗС-24, БС-8, СС-15 в комбинации с запирающими светофильтрами ЖС-18 и специального нефлуоресцирующего иммерсионного масла с $n_D^{20}=1,515\pm0,002$.

Для оценки интенсивности специфического свечения бактериальной клетки использовали общепринятую четырехкрестовую систему учета результатов [13].

Положительным результатом являлось специфическое свечение клеточной стенки микробной клетки в каждом поле зрения с яркостью на 4 креста или 3 креста, так называемый феномен Кунса. Отрицательным результатом считали слабое свечение на 1–2 креста. Максимальное разведение, которое обеспечивало яркое (на 4+ и 3+) иммунофлуоресцентное свечение клеточной стенки микробных клеток, соответствовало красящему титру. В качестве рабочего разведения использовали удвоенный красящий титр [2].

Специфическую активность и специфичность меченных флуорохромом иммуноглобулинов оценивали по результатам МФА, выполненного с использованием фиксированных мазков-препаратов микробных клеток музейных штаммов буркхольдерий II группы патогенности (*B. pseudomallei* и *B. mallei*) и III-IV группы патогенности (*B. thailandensis*, *B. cepacia*, *B. gladioli* (*P. allicola* и *P. marginata*), *P. putida*), приготовленных из бактериальных взвесей с концентрацией 10^9 м.к./мл.

Окраску мазков выполняли экспериментальными конъюгатами в рабочих разведениях.

Спектр специфической активности флуоресцирующих МКА определяли на наборе штаммов *B. pseudomallei*, специфичность приготовленных образцов препаратов – на наборе штаммов *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. ceracia*, *B. gladioli*, *P. putida*.

Диагностические возможности полученных экспериментальных конъюгатов МКА+флуорохром проверены на фиксированных и обеззараженных мазках-отпечатках, приготовленных из материала биопробных животных.

Все экспериментальные образцы иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных были приготовлены на основе МКА 3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6A₁₁, 6B₇, 6E₇, 6F₉, 7A₈, выделенных из АЖ.

Готовые препараты, охарактеризованные по всем вышеназванным параметрам качества, разливали по 0,5 мл в ампулы и хранили при минус 20 °С или лиофильно высушивали. Лيوфилизированные препараты хранили при температуре от плюс 4 °С до плюс 8 °С.

2.18 Получение экспериментальных образцов МКА, меченных пероксидазой хрена

Метку МКА ферментом проводили по методу Nakane с соавт. [106], используя ПХ с RZ не менее 3,0. Очистку ИПК от несвязавшихся компонентов проводили гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-100 0,1М фосфатным буфером, рН 7,5. Фракции со спектрофотометрическими показателями ОП₄₀₃/ОП₂₈₀, равными 0,4 – 0,6, объединяли, разводили 1:1 глицерином и хранили при минус 8 °С. Рабочее разведение ИПК определяли методом шахматного титрования в двухкомпонентной реакции: контрольный АГ+МКА, меченные ферментом. Готовые ИПК использовали в качестве детектирующего реагента в экспериментальной тест-системе иммуноферментной, а также в иммуноблоттинге.

2.19 Метка моноклональных антител биотином

Биотинилирование моноклональных иммуноглобулинов проводили по следующей методике: для подготовки свежего раствора NSB (N-hydroxysuccinimidobiotin) 2 мг биотина растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида, доводя объем до 2 мл. Приготовленный NSB капельно добавляли к раствору МКА (1 мг/мл) в соотношении 1:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов. Объем раствора доводили 0,05 М фосфатным буфером с pH 7,0 до 1 мл и диализовали против фосфатного буфера. Рабочее разведение конъюгата определяли методом шахматного титрования в двухкомпонентной реакции: гомологичный АГ + МКА, меченные биотином с последующим добавлением конъюгата пероксидазы со стрептавидином.

2.20 Статистические методы обработки результатов опытов

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

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ МКА К АНТИГЕНУ 200 kDa ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

3.1 Выведение гибридом-продуцентов из криоконсервированного состояния, адаптация к условиям культивирования

Гибридомы-продуценты МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, постоянно хранящиеся в жидком азоте, использовали в работе в качестве источника получения МКА.

Сразу после размораживания коллекционных образцов гибридом-продуцентов МКА, взаимодействующих с эпитопами гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei* 100, была определена их жизнеспособность. Относительные показатели числа жизнеспособных клеток в культурах представлены на рисунке 1.

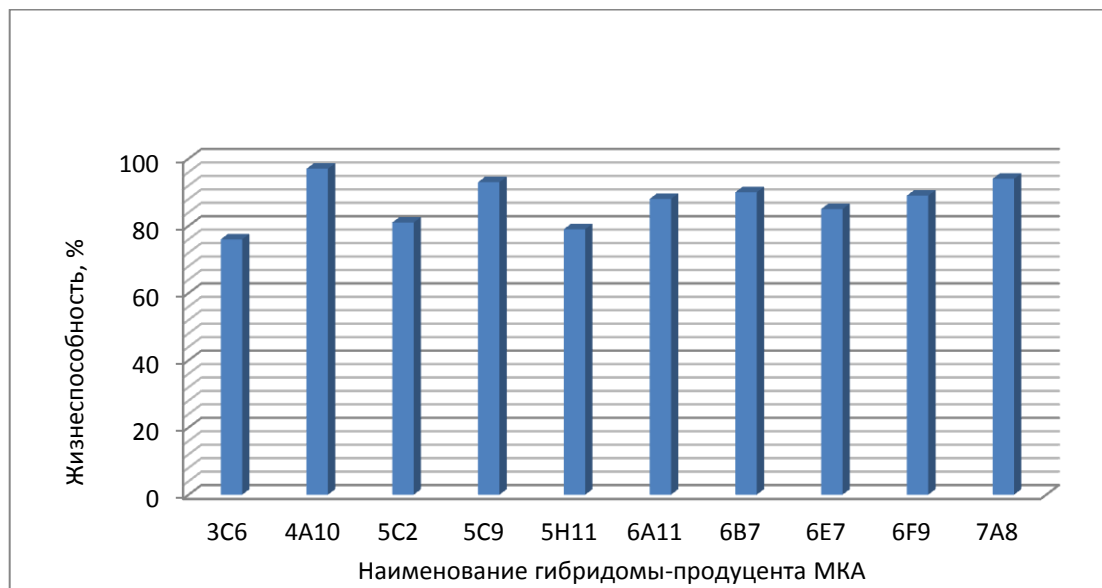


Рисунок 1 - Относительные показатели жизнеспособности гибридом-продуцентов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза, сохранявшихся в криоконсервированном состоянии в течение 3-4 лет.

Данные, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о хорошем состоянии гибридом после их размораживания.

С целью быстрого восстановления функции антителопродукции на уровне паспортных данных и пролиферативных показателей каждую из гибридом вновь реклонировали.

3.2 Накопление МКА *in vitro* и *in vivo*

Дальнейшие этапы работы были связаны с накоплением МКА *in vitro* и *in vivo*.

Накопление *in vitro* проходило согласно общепринятым рекомендациям [76]. Оценку интенсивности антителопродукции проводили с помощью тестирования в ТИФМ образцов среды из лунок с моноклонами, специфическую активность определяли посредством НМФА.

Для накопления МКА *in vivo* в брюшной полости мышей в составе асцитических жидкостей необходимо было осуществить тиражирование клеток каждого из отобранных для работы субклонов в культуральной среде. По мере увеличения популяции часть клеток пересевали с малых лунок в лунки больших объемов (24-л, 12-л, 6-л, чашки Петри).

При накоплении МКА *in vivo* в виде асцитов в брюшной полости у мышей BALB/с введение клеток осуществляли группе мышей BALB/с, по 2-3 мыши, а в сумме по 15 – 35 особей для каждого варианта гибридом. Клетки вводили внутрибрюшинно предварительно пристанизированным мышам, по $2 \cdot 10^6$ - $5 \cdot 10^6$ клеток/мышь. По окончании опыта оценивали результаты прививаемости гибридом *in vivo* и рассчитывали показатели объемов получаемых асцитов (таблица 1).

Таблица 1 - Прививаемость различных гибридом *in vivo*

Наименование гибридомы- продуцента МКА	Показатель прививаемости гибридом <i>in vivo</i> , в процентах	Объем полученных АЖ, в мл ($M \pm \sigma$)
3C ₆	88	3,1 $\pm$ 0,4
4A ₁₀	75	2,9 $\pm$ 1,2
5C ₂	94	4,8 $\pm$ 0,7
5C ₉	88	2,2 $\pm$ 0,4
5H ₁₁	78	4,2 $\pm$ 1,7
6A ₁₁	92	3,2 $\pm$ 0,4
6B ₇	84	4,5 $\pm$ 2,1
6E ₇	72	4,0 $\pm$ 0,7
6F ₉	64	3,9 $\pm$ 1,5
7A ₈	58	3,1 $\pm$ 0,6
Примечание: АЖ - асцитическая жидкость; М - средняя арифметическая величина; σ – стандартное отклонение.		

Приведенные в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что гибридомы обладали различной прививаемостью и способностью к асцитообразованию. Причем величина показателей асцитообразования не всегда коррелировала с их пролиферативной активностью *in vitro*. Наиболее активной с точки зрения способности вызывать асцит у мышей являлась гибридома 5C₂.

3.3 Выделение и очистка специфических иммуноглобулинов

После накопления образцов сред выращивания (КЖ) гибридом и одноименных АЖ были выполнены этапы очистки МКА с помощью метода сульфатного осаждения (при 50 % насыщения). С помощью ИЭФ было

подтверждено, что данный метод обеспечивал высокую степень очистки полученных образцов МКА.

3.4 Характеристика МКА, направленных к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

3.4.1 Характеристика антигенных препаратов

Первым этапом было изучение антигенного профиля водно-солевых экстрактов бактерий *B. pseudomallei* и ряда серий ФЭ штамма *B. pseudomallei* 100 с помощью вертикального электрофореза в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия по U. K. Laemmli [87], а также обнаружение биополимерных фракций белкового и гликопротеинового состава с помощью методики дифференциального окрашивания электрофореграмм.

Среди исследуемых ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* характерными для всех проб оказались высокомолекулярные биополимеры с м.м. 202,3 kDa (201,8 – 203,6 kDa) и 177,2 kDa (175,6 – 178,5 kDa).

В составе всех исследованных образцов ФЭ штамма *B. pseudomallei* 100 было установлено наличие специфических антигенных фракций с м.м. 202,9 kDa (199,3 – 207,6 kDa), 68,2 kDa (66,7 – 69,4 kDa), 64,9 kDa (64,2 – 65,6 kDa) и 57,5 kDa (56,1 – 58,1 kDa).

Химический состав исследованных ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и ряда серий ФЭ штамма *B. pseudomallei* 100 был установлен с использованием как биохимических методов определения концентрации белков и углеводов в составе изученных проб, так и с применением дифференциальных методов окраски гелей после SDS-PAGE на выявление гликопротеинов.

Для определения гликопротеинов на электрофореграммах была использована модифицированная методика Zacchrius R.M. и др. с применением йодной кислоты и реактива Шиффа [128] и метод окрашивания гелей алциановым

синим [154]. Результаты дифференциального окрашивания представлены на рисунке 2.

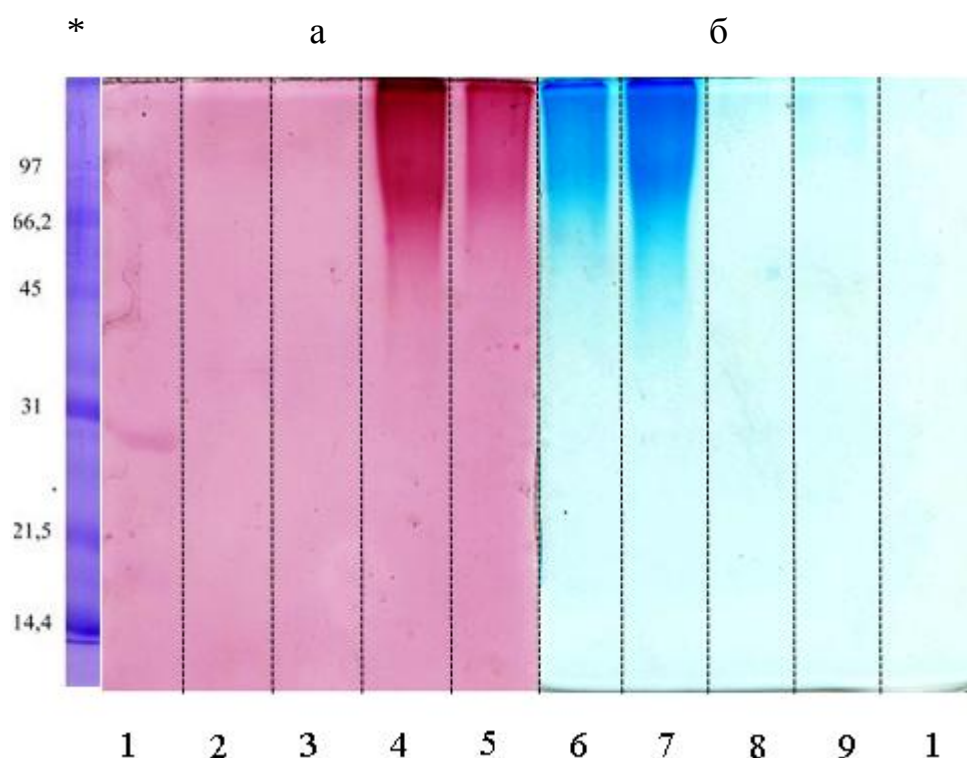


Рисунок 2 - Дифференциальное окрашивание гелей после SDS-PAGE реактивом Шиффа с йодной кислотой (а) и алциановым синим (б), Кумасси синим R-250 (*).

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.

Наибольшее содержание гликопротеиновой фракции было выявлено в исследованных сериях ФЭ штамма *B. pseudomallei* 100, (фракция занимает область м.м. от 202,9 kDa до 57,5 kDa). В антигенном профиле ВСЭ штамма *B. pseudomallei* 100 биополимеры гликопротеиновой природы присутствовали в небольшом количестве.

Полученные данные о содержании гликопротеинов в образцах антигенов были подтверждены при определении концентрации углеводов по Дюбо. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав антигенных образцов

Показатель, мг/мл	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	Контрольный АГ	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер.5	ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 сер.7
Углеводы по Дюбо	3,0	37,5	3,1	39,7
Белок по Лоури	35,5	1,6	0,4	0,4

Таким образом, получены данные о суммарном антигенном профиле исследованных образцов водорастворимых антигенов, изолированных из обеззараженных ацетоном микробных клеток ряда штаммов *B. pseudomallei* (ВСЭ) и антигенов, экстрагированных формамидом (ФЭ) из *B. pseudomallei* 100. Последующая дифференциальная окраска полученных электрофореграмм на определение белковых и гликопротеиновых фракций продемонстрировала сложный химический состав антигенных компонентов, входящих в состав исследованных ВСЭ и ФЭ штаммов *B. pseudomallei*.

3.4.2 Определение специфической активности МКА, накопленных *in vivo* и *in vitro*

Активность всех вариантов МКА в отношении гомологичного антигена 200 kDa определяли в непрямом варианте ТИФМ (таблица 3).

Таблица 3 - Характеристика полученных образцов МКА против эпитопов гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei* 100 в ТИФМ

Наименование МКА	Специфическая активность МКА в ТИФМ (титр), накопленных	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
3C ₆	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-5}$
4A ₁₀	$5 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-3}$
5C ₂	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-5}$
5C ₉	$2 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$
5H ₁₁	$5 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-3}$
6A ₁₁	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$
6B ₇	$2 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-5}$
6E ₇	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$
6F ₉	$2 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$
7A ₈	$5 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-5}$

Исследование образцов МКА в ТИФМ позволило выявить варианты, наиболее активно взаимодействующие с контрольным антигеном (формамидный экстракт *B. pseudomallei* 100).

3.4.3 Изучение активности МКА с помощью НМФА

Для подтверждения взаимодействия полученных МКА с эпитопами, локализованными на поверхности микробных клеток *B. pseudomallei*, использовали НМФА.

С помощью НМФА были получены доказательства взаимодействия исследованных вариантов МКА с эпитопами, экспонированными на поверхности микробных клеток *B. pseudomallei* 100. Этот высоковирулентный штамм является

источником получения всех серий гликопротеина 200 kDa, применявшихся в данной работе. Установлено, что эпитопы, узнаваемые каждым из изученных вариантов МКА, экспрессированы на поверхности микробных клеток высоковирулентного штамма *B. pseudomallei* 100 с различной плотностью, о чем свидетельствовали показатели удельной активности этих иммуноглобулинов, существенно отличавшиеся друг от друга. Данные об удельной активности МКА представлены на рисунке 3.

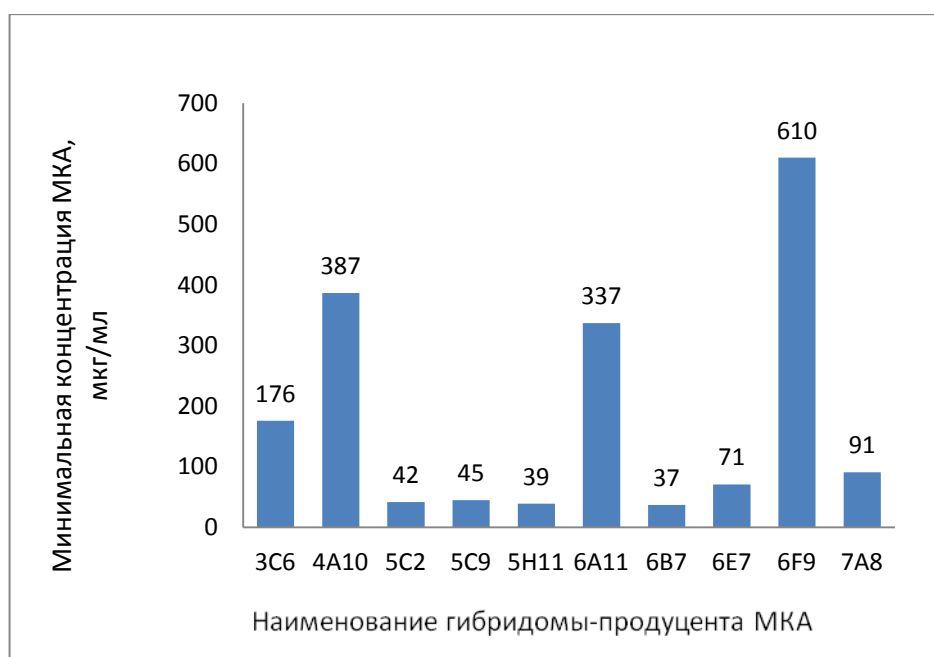


Рисунок 3 - Сводные данные проверки МКА, накопленных *in vitro*, в НМФА с *B. pseudomallei* 100.

На рисунке 3 представлены сводные данные о минимальных концентрациях каждого из МКА, обеспечивавших получение положительного результата в НМФА. Высокие показатели удельной активности МКА, характеризующиеся свечением клеток контрольного штамма на 3 и 4 креста, свидетельствовали о том, что наиболее перспективной основой для изготовления экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных являются МКА 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6B₇, 6E₇, 7A₈.

3.4.4 Определение преципитирующей активности образцов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

Вскоре после внедрения гибридной технологии в широкую практику научных лабораторий была доказана эффективность использования МКА в РИД на этапах идентификации различных микроорганизмов [119].

РИД является дополнительным тестом, характеризующим свойства МКА. Преципитирующие свойства МКА используют на этапе идентификации чистых культур, однако эта реакция не входит в схему лабораторной диагностики мелиоидоза [7]. Этот метод чаще всего применяют для аналитического изучения различных антигенных препаратов *B. pseudomallei*. Исследования подобного рода проводят с экспериментальными образцами МКА, получаемыми в различных лабораториях.

В то же время, при выполнении настоящей работы были получены данные, свидетельствующие о том, что метод двойной иммунодиффузии в геле можно использовать в качестве теста, позволяющего дополнить сведения об изучаемом антигене или выявить перекрестные реакции с близкородственными видами бактерий.

В данной работе РИД была применена для выполнения следующих практических разделов:

- подтверждение гомогенности очищенных образцов МКА и их видовой принадлежности;
- изучение возможности использования МКА для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза.

С помощью РИД с антивидовой кроличьей сывороткой к иммуноглобулинам мыши была экспериментально доказана гомогенность образцов МКА и видовая принадлежность антител.

Эффективность использования МКА для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза была изучена при постановке реакции преципитации с водно-солевыми экстрактами антигенов возбудителей мелиоидоза. Результаты

проверки семи вариантов МКА к различным эпитопам антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза представлены в таблице 4.

С помощью РИД с ВСЭ возбудителя мелиоидоза было установлено, что 7 типов МКА из 10 в разной степени обладали преципитирующей активностью. Четыре типа МКА (3C₆, 4A₁₀, 6A₁₁, 6E₇) позволяли обнаружить антиген 200 kDa у 72-81 % коллекционных штаммов *B. pseudomallei*, два МКА (5C₂ и 7A₈) выявляли антиген у 36 % штаммов. Интересно отметить, что все семь вариантов МКА преципитировали только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов.

Таблица 4 – Сводные данные эффективности обнаружения антигена 200 kDa в ВСЭ различных штаммов возбудителя мелиоидоза по результатам РИД

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: МКА были взяты в концентрации от 12 до 15 мг/мл; ВСЭ из м.к. штамма <i>B. pseudomallei</i> в концентрации от 10 до 12 мг/мл.							

Сведения о способности МКА образовывать преципитаты с растворимыми антигенами возбудителя мелиоидоза также были значимы для решения вопроса об их применении в иммунохимическом анализе (dot-иммуноанализ, иммуноблоттинг).

3.4.5 Определение класса специфических иммуноглобулинов

Накопленные МКА были протестированы на принадлежность к различным классам иммуноглобулинов. Изотипирование выявило принадлежность девяти из них к классу IgM (3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6A₁₁, 6B₇, 6E₇, 7A₈) и одного – к IgA (6F₉).

3.4.6 Определение констант аффинности МКА

Аффинность моноклональных антител характеризует прочность связывания активных центров антитела с определенным участком (эпитопом) антигена. При подборе сырья для иммунодиагностических тестов предпочтение отдают высокоактивным, специфичным МКА, обладающим высокими показателями аффинности.

Аффинность количественно измеряли с помощью определения константы связывания [45]. Константу связывания моноклональных антител определяли непрямым вариантом иммуноферментного анализа.

Для этого производили двукратное титрование образцов МКА в лунках планшетов с предварительно сорбированным антигеном 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* 100 (контрольная серия) в концентрации 5 мкг/мл и 2,5 мкг/мл.

Строили графики зависимости величины оптической плотности от логарифма разведения и вычисляли разведение МКА, которое соответствовало 50 % снижению сигнала окрашенных лунок, то есть двукратному уменьшению количества связавшихся с носителем антител. Сродство МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* 100 определяли с помощью расчета константы гетерофазного равновесия образования комплексов антиген-антитело по формуле (3) [45]:

$$K_{\text{aff}} = 1/2(2[Ab''] - [Ab']), \quad (3)$$

где Ab'' – значение концентрации МКА при нагрузке антигена 2,5 мкг/мл,

Ab' – при концентрации 5 мкг/мл.

Таблица 5 - Константы аффинности МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*

Наименование МКА	Значение $K_{\text{aff}} (M^{-1})$
3C ₆	$9 \cdot 10^5$
4A ₁₀	$6 \cdot 10^7$
5C ₂	$2 \cdot 10^8$
5C ₉	$8 \cdot 10^7$
5H ₁₁	$2 \cdot 10^7$
6A ₁₁	$1,75 \cdot 10^7$
6B ₇	$5 \cdot 10^6$
6E ₇	$5 \cdot 10^6$
6F ₉	$2 \cdot 10^8$
7A ₈	$2 \cdot 10^7$
2A ₆	$8 \cdot 10^7$
Примечание - Показатели константы аффинности соответствуют средней арифметической ее величины (М).	

Величины констант варьировали от $9 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^8 M^{-1}$, что свидетельствовало о разной степени связывания полученных моноклональных антител с гомологичными им участками контрольного антигена.

Затем изучали конкурентные взаимоотношения пар МКА.

Для определения характера взаимоотношений пар МКА с антигеном 200 kDa *B. pseudomallei* 100 использовали конкурентный ТИФМ.

Применяли методику, предложенную Friguet В. с соавторами [66]. Пластины сенсibilizировали антигеном 200 kDa *B. pseudomallei* 100 (контрольная серия) в концентрации 10 мкг/мл. Затем производили титрование МКА, выделенных из асцитической жидкости, с целью определения их минимальных насыщающих концентраций.

По динамике изменения оптической плотности в лунках в зависимости от разведения МКА строили графики, необходимые для выявления точек перегиба кривых. Точка перегиба на графике соответствовала точке эквивалентных концентраций АГ-АТ.

Для МКА 3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 5C₉, 5H₁₁, 6A₁₁, 6B₇, 6E₇, 6F₉, 7A₈ их эквивалентные концентрации достигались при разведении образцов МКА в 4000, 2000, 4000, 2000, 4000, 2000, 4000, 2000, 4000, 2000 раз соответственно.

Далее измеряли ОП для каждого МКА в отдельности в его эквивалентной концентрации, а также при совместной инкубации двух МКА. Полученные данные использовали для расчета индекса аддитивности для пары МКА по формуле (4):

$$K = \left[\frac{2A_1 + 2}{A_1 + A_2} - 1 \right] * 100\%, \quad (4)$$

где $A_1 + 2$ - ОП, полученная при совместной инкубации двух МКА;

$A_1 + A_2$ - ОП, полученная для каждого из этих МКА в отдельности.

Учитывали, что значение индекса более 50 % свидетельствует об аддитивном связывании пар МКА, то есть об их разной эпитопной направленности, а значение менее 20-30 % отражали конкурентные взаимоотношения антител, составляющих определенную пару.

Полученные значения индексов (в процентах) представлены в таблице 6.

Для формирования диагностически значимых пар выбрали из имеющейся панели из десяти МКА высокоаффинные антитела, не конкурирующие за общие сайты связывания на антигене.

Дополнительно исследовали конкурентные взаимоотношения между 3C₆, 5C₂ и 2A₆, которые использовали в смеси 3C₆+5C₂+2A₆ для имитации поликлонального эффекта на подложке, то есть повышения прочности связывания с тремя различными эпитопами искомой мишени (антигена). Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 6 - Результаты расчета индексов аддитивности МКА

Наименование МКА	Индекс аддитивности МКА, $M \pm \sigma$, в процентах								
	4A ₁₀	5C ₂	5C ₉	5H ₁₁	6A ₁₁	6B ₇	6E ₇	6F ₉	7A ₈
3C ₆	70,2±17,9	100±38,5	58,2±18,3	28,7±13,8	3,6±6,8	-	35,0±10,1	22,8±6,7	30,6±10,2
4A ₁₀	*	100±18,2	-	35,0±13,6	100±5,2	60,2±8,9	84,5±7,1	58,9±4,1	25,6±4,4
5C ₂		*	-	17,3±2,1	20,2±7,1	32,8±9,0	46,3±7,7	18,2±8,2	19,6±6,4
5C ₉			*	59,0±13,1	36,4±3,8	13,2±17,0	39,5±11,1	12,1±6,9	19,3±6,4
5H ₁₁				*	71,0±9,4	47,1±7,4	51,7±14,8	54,6±8,6	35,8±7,6
6A ₁₁					*	49,5±5,1	23,2±5,9	25,8±3,4	16,9±4,9
6B ₇						*	16,4±10,5	23,7±6,1	18,9±10,3
6E ₇							*	20,8±3,1	43,2±8,9
6F ₉								*	57,2±7,5

Примечание:

1. М - средняя арифметическая величина;
2. σ – стандартное отклонение;
3. * - совпадение пар МКА;
4. (-) – индекс аддитивности, близкий к нулю.

Таблица 7 - Результаты расчета индексов аддитивности МКА

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

3.5 Изучение свойств МКА в иммуноблоттинге

Изучение свойств МКА в иммуноблоттинге позволило определить эпитопную специфичность полученной панели МКА к антигенным детерминантам гликопротеина 200 kDa *B. pseudomallei*. Для выполнения этого раздела были приготовлены иммунопероксидазные конъюгаты на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* (глава 5, раздел 5.2).

Прежде, чем выполнять блоттинг с ВСЭ, необходимо было подтвердить факт взаимодействия каждого из конъюгатов с целым спектром штаммов *B. pseudomallei*, то есть проверить их спектры специфической активности.

Полученные ИПК на основе МКА были использованы при постановке прямого варианта ТИФМ с ВСЭ *B. pseudomallei*. Антигены, растворенные в КББ (рН 9,5), наносили на твердую фазу в концентрации 10 мкг/мл. Результаты проверки спектра специфической активности ИПК на основе МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Определение активности ИПК в прямом варианте ТИФМ (ВСЭ *B. pseudomallei* + ИПК моноклональные)

Результат ТИФМ с применением различных ИПК, обратное значение титра									
ИПК	Штамм <i>B. pseudomallei</i>								
	100	51274	60913	57576	59361	110	51274	56738	56770
3C ₆	128	32	64	64	128	64	256	128	512
4A ₁₀	8	4	16	8	4	8	8	8	32
5C ₂	128	32	32	32	32	8	16	32	128
6A ₁₁	64	32	64	128	64	64	128	64	512
6E ₇	128	8	64	16	8	8	8	8	32
6F ₉	32	16	32	32	32	13	32	16	128
7A ₈	16	8	16	8	4	4	4	4	32

Таким образом, был определен спектр специфической активности ИПК, а также подтвержден факт взаимодействия каждого из ИПК с целым набором штаммов *B. pseudomallei*. Данные, представленные в таблице 8, позволили определить наиболее подходящие варианты ИПК на основе МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* для изучения в блоттинге.

Рабочее разведение экспериментальных ИПК для постановки иммуноблоттинга определяли с помощью метода dot-иммуноанализа на нитроцеллюлозной мембране [47]. Сравнительная оценка результатов прямого варианта dot-иммуноанализа с исследованными ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и ряда серий ФЭ *B. pseudomallei* 100 позволила установить рабочее разведение ИПК, равное 1:50, обеспечивающее специфическое взаимодействие МКА с указанными образцами антигенов.

Иммуноблоттинг с применением антигенов образцов ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* и различных серий ФЭ *B. pseudomallei* 100 позволил установить подробную картину специфического взаимодействия экспериментальных ИПК с биополимерами различной м.м., которые входят в их антигенный спектр, а также

получить представление об эпитопной плотности и направленности использованных в работе МКА (таблица 9).

Наибольшее количество выявленных эпитопов в составе антигенного профиля всех использованных в иммуноблоттинге образцов ВСЭ и серий ФЭ установлено у ИПК 5C₂, который суммарно связался с гомологичными эпитопами, экспонированными на 17 биополимерах с м.м. в области от 37 kDa до 18,4 kDa, образовавшимися после деградации исходных комплексных антигенов под воздействием додецилсульфата натрия.

Как показали результаты иммуноблоттинга, МКА 3C₆, 6B₇ и 6A₁₁ выявили 12 антигенных фракций в составе всех исследованных ВСЭ и ФЭ, но их эпитопная направленность имела различия: МКА 6B₇ обнаруживал в составе 22 серии ФЭ *B. pseudomallei* 100 компонент с м.м. 37 kDa, а 3C₆ - антиген 18,4 kDa - в ВСЭ *B. pseudomallei* 100.

ИПК 6E₇ повторял картину эпитопного взаимодействия 6B₇, 6A₁₁ и 3C₆ с биополимерами изученных образцов ВСЭ и ФЭ, за исключением детекции антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 100, которые располагаются в районе 26,2 – 18,4 kDa.

ИПК 4A₁₀ «находил» гомологичные им эпитопы лишь в составе двух антигенных фракций ВСЭ *B. pseudomallei* 100 и продемонстрировал отрицательный результат с эпитопами ВСЭ штамма *B. pseudomallei* 59361 и 22 серии ФЭ *B. pseudomallei* 100.

Характер связывания эпитопов антигенов ФЭ с ИПК 7A₈ не отличался от большинства испытанных моноклональных конъюгатов. Данный ИПК выявлял 4 антигена в составе ВСЭ штаммов *B. pseudomallei*. ИПК 6F₉, так же как и 5C₂, продемонстрировал взаимодействие со всеми установленными специфическими эпитопами в составе антигенов ВСЭ штаммов *B. pseudomallei* 59361 и 56770.

В профиле контрольного антигена все исследованные МКА нашли гомологичные им эпитопы.

Таблица 9 - Эпитопная направленность МКА к антигенам *B. pseudomallei*

Антиген	№ реф. полос. ¹	м.м антигенов ²	Экспериментальные ИПК							
			5C ₂	6B ₇	6A ₁₁	3C ₆	6E ₇	4A ₁₀	7A ₈	6F ₉
BCЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	27	37,0	+	+	+	+	+	+	+	+
	28	35,8	+	+	+	+	+	-	-	+
	30	33,9	+	+	+	+	+	+	+	+
	34	26,2	+	+	+	+	-	-	-	-
	35	24,3	+	-	-	-	-	-	-	-
	37	21,3	+	+	+	+	-	-	-	-
	39	18,4	+	-	-	+	-	-	-	-
BCЭ <i>B. pseudomallei</i> 56738	29	34,9	+	+	+	+	+	+	-	+
	30	33,8	+	+	+	+	+	+	-	+
BCЭ <i>B. pseudomallei</i> 56770	34	25,7	+	+	+	+	+	-	-	+
	39	18,4	+	-	-	-	-	+	+	+
BCЭ <i>B. pseudomallei</i> 59361	29	35,1	+	-	+	+	+	-	+	+
	32	29,5	+	-	-	-	-	-	-	-
ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100 с. 22	10	36,6	+	+	-	-	-	-	-	-
контрольный АГ	11	32,9	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	21,6	+	+	+	+	+	+	+	+
	17	18,6	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание:

1. Референтные полосы, полученные путем выравнивания антигенных фракций одного уровня м.м. в программе «TotalLab TL120»[©] («TotalLab Ltd.»);
2. м.м. антигенов в составе протеинограмм изученных BCЭ штаммов *B. pseudomallei* и серий ФЭ *B. pseudomallei* 100;
3. (+) - положительный результат;
4. (-) - отрицательный результат.

В результате выполнения данного раздела работы методом вертикального электрофореза в SDS-PAGE установлено наличие нескольких обязательных мажорных компонентов в составе антигенных комплексов ВСЭ и ФЭ *B. pseudomallei*, доказана гликопротеиновая природа некоторых образцов антигенов с помощью методики дифференциального окрашивания, иммуноблоттингом определена эпитопная направленность ряда МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза.

Таким образом, результатом последовательного воспроизведения размораживания гибридом-продуцентов МКА, их реклонирования, отбора субклонов с высокими показателями антителопродукции и пролиферативной активности, тиражирования подготовленных для работы культур *in vitro* и *in vivo*, получения препаративных количеств очищенных моноклональных иммуноглобулинов, определения их специфической активности, подтверждения взаимодействия с поверхностно локализованными антигенами бактериальных клеток стало приготовление образцов 10 типов МКА, которые являлись основой для последующего изготовления экспериментальных серий препаратов для МФА и ТИФМ.

ГЛАВА 4 ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНА 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

Одной из задач диссертационной работы являлось получение экспериментальных образцов препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных из панели антител к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза и оценка качества полученных конъюгатов ФИТЦ-МКА.

На первом этапе оценивали активность и специфичность полученных образцов МКА в НМФА (Глава 3, раздел 3.5.2). По данным этой проверки был сделан вывод о пригодности МКА для последующего изготовления конъюгатов с флуорохромом.

Для изготовления экспериментальных образцов диагностических препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих были использованы МКА, выделенные из асцитической жидкости, с высокой активностью в ТИФМ и НМФА. Каждый из десяти вариантов МКА был конъюгирован с флуорохромом.

4.1 Свойства иммуноглобулинов флуоресцирующих, приготовленных на основе различных вариантов МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

После очистки конъюгатов и расчета основных показателей результативности конъюгирования флуоресцеин-5-изотиоцианата с белком для последующей работы был отобран ряд экспериментальных серий, охарактеризованных по показателям концентрации белка в препарате, молярного соотношения ФИТЦ/белок и величине рабочего разведения. Свойства этих препаратов представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Свойства экспериментальных образцов серий конъюгатов МКА-ФИТЦ

Наименование конъюгата	Концентрация белка, мг/мл	М _{ФИТЦ} /М _{белок}	Рабочее разведение*
3C ₆	4,6	8,8	1:32
4A ₁₀	2,6	3,9	1:8
5C ₂	6,8	8,0	1:32
5H ₁₁	2,6	5,5	1:4
6A ₁₁	7,0	6,7	1:8
6B ₇	5,1	4,6	1:8
6E ₇	4,75	5,9	1:16
7A ₈	3,55	3,7	1:4
Примечание - *- данные получены при просмотре мазков-препаратов, приготовленных из взвеси <i>B. pseudomallei</i> 100 и окрашенных конъюгатами МКА-ФИТЦ.			

Полученные данные показали, что из 10 типов МКА лишь четыре (3C₆, 5C₂, 5H₁₁, 6A₁₁) по своим параметрам перспективны для дальнейшего изучения. Эти МКА сохраняли стабильность в процессе конъюгирования. Серии препаратов на их основе ампулировали (по 0,5 мл), половину из которых хранили при минус 20 °С, а вторую половину лиофилизировали. Сравнительная оценка активности препаратов до и после лиофилизации показала, что использованный режим лиофильного высушивания МКА, меченных флуорохромом, не изменил их иммунологическую активность: снижения показателя рабочего разведения конъюгатов МКА-ФИТЦ не зарегистрировано.

Следующим этапом работы явилась оценка спектра специфической активности для выбранной группы экспериментальных препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных. Для этого использовали широкий набор музейных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза. В качестве препарата сравнения

был взят производимый в настоящее время стандартный препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные сухие». Результаты выполненных экспериментов представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Определение спектра специфической активности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих моноклональных в отношении *B. pseudomallei*

<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

Данные, приведенные в таблице 11, позволяют сделать вывод о том, что препараты иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных 3C₆, 5C₂, 5H₁₁, 6A₁₁ характеризовались высокими показателями специфической активности в отношении различных штаммов гомологичного вида *B. pseudomallei*. Наибольшей активностью в отношении возбудителя мелиоидоза, обладали иммуноглобулины флуоресцирующие моноклональные на основе 6A₁₁. В качестве положительного контроля, подтверждающего правильность постановки реакции, использовали производимый в настоящее время на основе МКА 1F₄ к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза.

По результатам окрашивания мазков-препаратов, приготовленных из взвесей штаммов *B. mallei*, условно-патогенных буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов III-IV групп патогенности, определяли специфичность конъюгатов в МФА. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 – 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. ceracia</i> (n=5)	-	-	1	-	-
<i>B. gladioli</i> , <i>P. putida</i> (n=4)	-	-	-	-	-
Примечание – (*) - препарат сравнения, производимый в настоящее время на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза, который согласно его паспортным данным, в рабочем разведении выявляет только <i>B. pseudomallei</i> , не взаимодействует с <i>B. mallei</i> и обладает кросс-реактивностью в отношении <i>B. thailandensis</i> .					

Установлено, что три из четырех препаратов (3C₆, 5H₁₁ и 6A₁₁) проявили себя как группоспецифичные диагностические средства, не взаимодействующие ни с одним из штаммов взятых в работу видов гетерологичных микроорганизмов. Один из них, конъюгат на основе МКА 5C₂, обладал перекрестной активностью в отношении одного из пяти штаммов *B. thailandensis* и одного из пяти штаммов *B. ceracia*. Наибольший интерес представляют данные об отсутствии кросс-реактивности МКА 3C₆, 6A₁₁, 5H₁₁ в отношении *B. thailandensis* – буркхольдерии, наиболее близкой в антигенном отношении *B. pseudomallei*. 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 два вида буркхольдерий [127].

4.2 Диагностические возможности экспериментальных иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных

Дальнейшее исследование было посвящено изучению диагностических возможностей экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных при работе с пробами биологического материала.

При воспроизведении регламентированной схемы индикации возбудителей особо опасных инфекций одним из обязательных этапов работы является исследование биопробного материала, в частности мазков-отпечатков селезенки [23].

Мазки-отпечатки селезенки золотистых хомячков, зараженных *B. pseudomallei*, были использованы для решения вопроса о способности приготовленных экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных специфически окрашивать микробные клетки возбудителя мелиоидоза в биологическом материале. В опытах использовали штаммы *B. pseudomallei* 101 и *B. pseudomallei* 102. Животных заражали с учетом LD₅₀ при внутрибрюшинном способе введения бактерий и вскрывали на 3 и 21 сутки после заражения.

Иммунофлуоресцентный анализ с МКА позволил уже через 3 суток после заражения выявить единичные клетки возбудителя мелиоидоза в мазках-отпечатках из селезенки. Экспериментальные данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты обнаружения возбудителя мелиоидоза в мазках-отпечатках селезенки биопробных животных с помощью МФА

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

Примечание:

(-) - отрицательный результат МФА;

(+) - положительный результат реакции, соответствующий 3+ и 4+;

* - препарат сравнения, производимый в настоящее время на основе МКА к термостабильному поверхностному антигену возбудителя мелиоидоза.

Как видно из таблицы 13, есть различия в обнаружении микробных клеток штаммов *B. pseudomallei* 101 и *B. pseudomallei* 102 через трое суток после заражения животных. При использовании всех вариантов конъюгатов возбудитель мелиоидоза не был обнаружен в отпечатках селезенки животных, зараженных *B. pseudomallei* 101, спустя трое суток. Через указанный промежуток времени три конъюгата из четырех выявляли микробные клетки *B. pseudomallei* 102 в пробах биологического материала. К 21 суткам количество антигена 200 kDa возрастало, и все варианты конъюгатов МКА-ФИТЦ давали положительный результат при просмотре мазков. При этом отмечено, что почти в каждом поле зрения имели место ПМЯЛ с внутриклеточно расположенными микробными клетками, окрашенными специфически, и их фрагментами. Эти данные свидетельствуют о том, что через три недели после заражения на

поверхности клеток увеличивается количество антигена 200 kDa.

Анализ результатов, обобщенных в таблице 13, свидетельствует о том, что все четыре варианта экспериментальных препаратов пригодны для исследования биологического материала.

Таким образом, на основе высокоактивных моноклональных иммуноглобулинов различной эпитопной направленности (МКА 3C₆, 5C₂, 5H₁₁, 6A₁₁), взаимодействующих с гликопротеином капсулы возбудителя мелиоидоза с м.м. 200 kDa, были получены экспериментальные образцы высокоактивных и специфичных диагностических препаратов для МФА, охарактеризованные по параметрам качества и пригодности для работы как с чистыми культурами буркхольдерий, так и с пробами материала биопробных животных.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ НА ОСНОВЕ МКА К АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

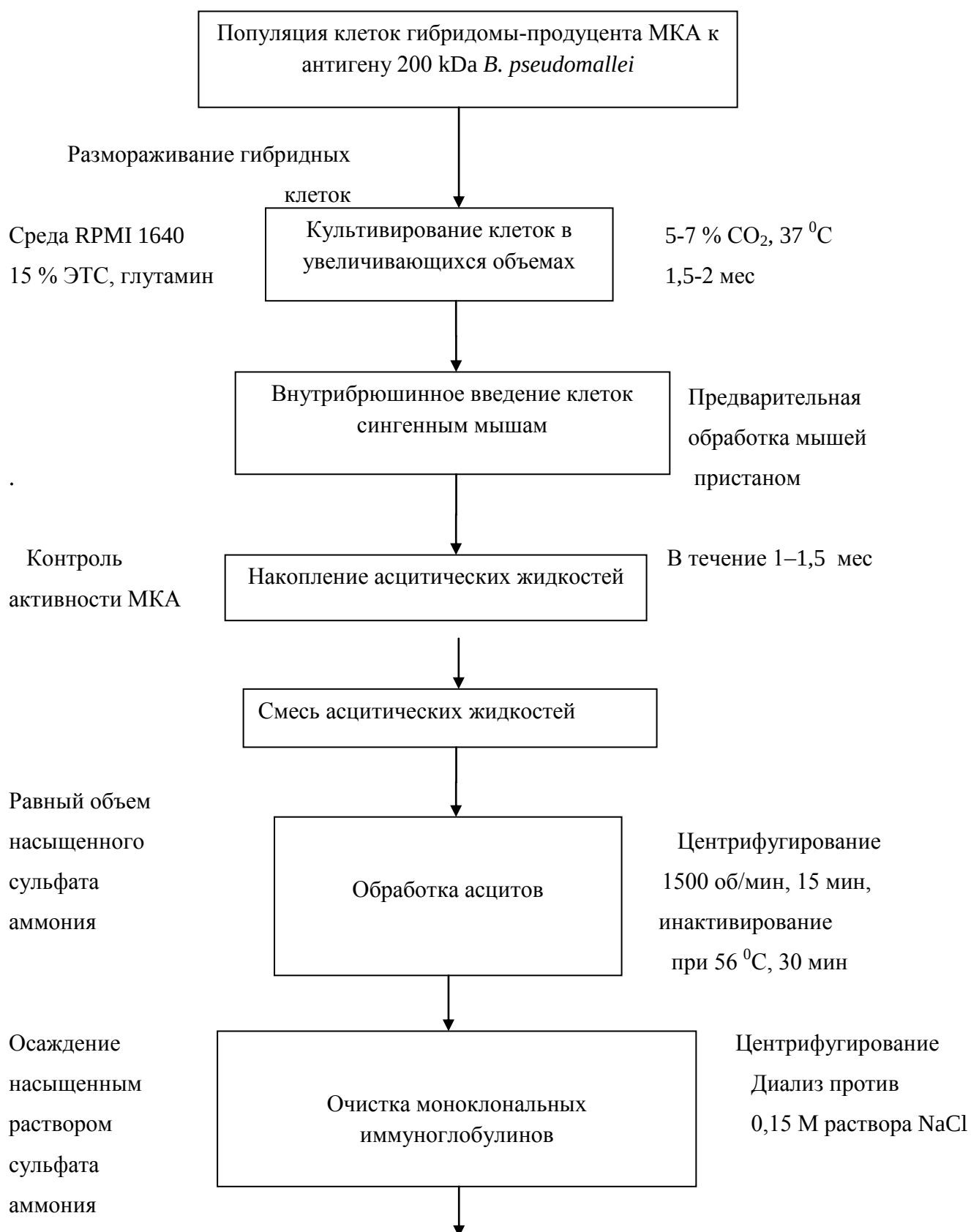
По данным ряда зарубежных исследователей, при создании тест-системы иммуноферментной на основе МКА на этапе захвата антигена нельзя использовать единичное антитело. Для адсорбции на твердой фазе целесообразно использовать смесь антител, что приводит к более эффективному и прочному связыванию искомого антигена. При этом МКА, входящие в состав смеси «антител захвата», должны быть различной эпитопной направленности в отношении антигенной мишени [81].

Также не рекомендуется конструировать тест-систему с применением одного и того же МКА в качестве антитела первого и второго порядка. Установлено, что ориентация на единичный вариант МКА может оказаться ошибочной в тех случаях, когда речь идет о «дрейфе» искомой мишени. В процессе работы по подбору ингредиентов для иммуноферментной тест-системы необходимо тщательно изучить все свойства каждого из МКА, входящих в панель иммуноглобулинов, направленных к эпитопам биополимера, имеющего диагностическое значение.

5.1 Биотехнологическая схема получения тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

Биотехнологическая схема лабораторного изготовления экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза состоит из двух основных этапов: получения сырья (препаративных количеств МКА, с подтвержденной активностью в ТИФМ и доказанной видовой принадлежностью в РИД) и работы с готовым сырьем. Схема представлена на рисунке 4.

1-й этап: получение сырья



Продолжение биотехнологической схемы лабораторного изготовления экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

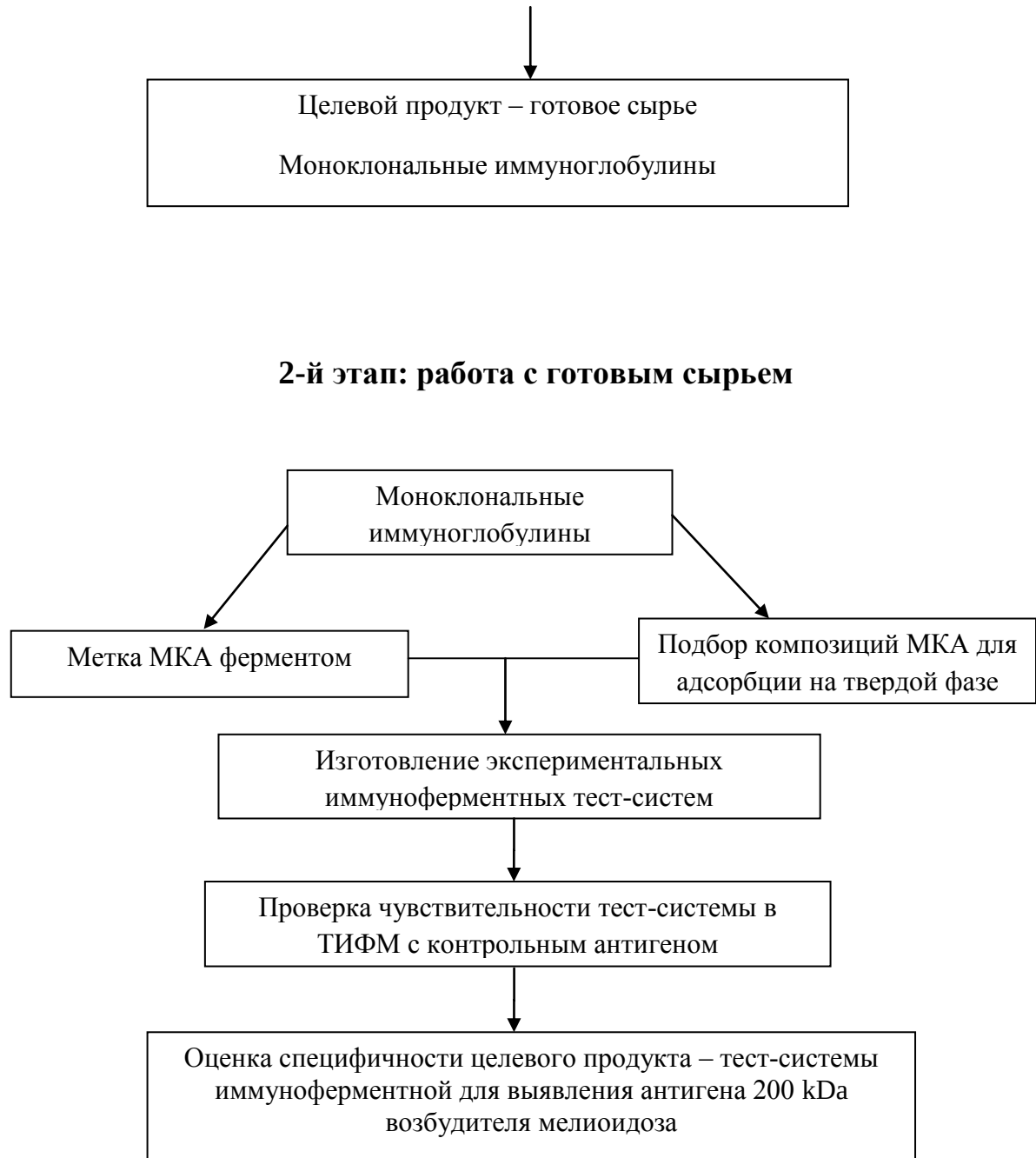


Рисунок 4 - Биотехнологическая схема получения тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

5.2 Иммунопероксидазные конъюгаты на основе МКА к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*

Со всеми образцами МКА был выполнен этап пробной метки ферментом для исключения из последующей работы тех вариантов МКА, которые в результате этой процедуры полностью или частично теряли иммунологическую активность.

ИПК готовили на основе МКА 3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 6A₁₁, 6B₇, 6E₇, 6F₉, 7A₈, выделенных из асцитических жидкостей мышей. После метки индивидуальных образцов моноклональных иммуноглобулинов производили очистку конъюгатов МКА - ПХ.

Полученные образцы ИПК тестировали в прямом варианте ТИФМ (АГ+ИПК), используя методику шахматного титрования и определяли рабочее разведение каждого из них.

Параметры качества полученных экспериментальных образцов моноклональных ИПК представлены в таблице 14.

По параметрам качества были выбраны следующие конъюгаты: 3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 6A₁₁, 6E₇, 6F₉, 7A₈. ИПК были лиофилизированы и проверены методом шахматного титрования в ТИФМ. Все конъюгаты сохранили рабочее разведение.

Таблица 14 - Параметры качества моноклональных ИПК по результатам ТИФМ

Наименование ИПК	Объем объединенной фракции I пика, мл	RZ объединенной фракции I пика	Рабочее разведение ИПК
3C ₆	5,0	0,4	1:160
4A ₁₀	4,0	0,39	1:40
5C ₂	3,9	0,39	1:160
6A ₁₁	4,5	0,46	1:80
6B ₇	6,0	0,42	1:80
6E ₇	3,5	0,41	1:80
6F ₉	3,0	0,39	1:160
7A ₈	4,0	0,43	1:160

5.3 Подбор компонентов экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

Следующий этап исследования был посвящен определению чувствительности сэндвич - варианта ТИФМ при условии использования каждого из полученных вариантов моноклональных ИПК для выявления искомого антигена (антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100).

Схема постановки реакции была следующей: AT₁+АГ+АТ₂ (ИПК).

АТ₁, антитела первого порядка, наносили на твердую фазу в качестве лиганда, осуществляющего захват антигена-мишени. В работе использовали различные варианты АТ₁:

1. индивидуальные образцы МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* 100;
2. композиции МКА;

3. поликлональный гамма-глобулин кроличьей гипериммунной мелиоидозной сыворотки (образец сравнения).

Все три варианта АТ₁ наносили на твердую фазу в концентрации 20 мкг/мл по белку, предварительно разводя в 0,05 М КББ, рН 9,5.

Для определения чувствительности иммуноферментной тест-системы использовали стандартный образец антигена 200 kDa в различных разведениях. Образец антигена содержал 1,06 мг/мл белка и 37,5 мг/мл ПС.

Выбор твердой фазы осуществляли с учетом производителя, номера серии и такой характеристики, как уровень сорбции. Для адсорбции антител были выбраны пластины высокого уровня сорбции (Costar high binding, США).

Экспериментально была установлена прямая зависимость чувствительности разрабатываемой тест-системы от характеристик антител, используемых в качестве «подложки». При постановке ТИФМ с поликлональным гамма-глобулином на твердой фазе выявление контрольного антигена регистрировали в концентрации от 168 до 42 мкг/мл, в зависимости от выбранного ИПК. Индивидуальные образцы МКА связывали различные количества антигена, а также не обеспечивали необходимую чувствительность метода. Более высокая чувствительность была отмечена при использовании для сорбции на пластике нескольких МКА с индексами аддитивности более 50 % для того, чтобы антитела в экспериментальной смеси не конкурировали за один и тот же сайт связывания на антигене. Подобного рода «подложка» создавала эффект поликлональности. Важную роль в выборе МКА играл их коэффициент аффинности.

В процессе выбора оптимальной композиции смеси МКА на этапе подготовки пластин для иммуноферментного анализа для адсорбции на пластинах использовали 6 различных смесей МКА разной эпитопной направленности при нагрузке белка 20 мкг/мл:

I - 2A₆+1E₅+Ppm I+ Ppm II+2H₇;

II - 2A₆+ Ppm II+2H₇;

III - 2A₆+ Ppm II+2H₇+1G₂;

IV - 3C₆+5C₂+2A₆;

V - 6A₁₁+6E₇+Ppm II;

VI - 3C₆+5C₂+Ppm II.

В результате проведения серии опытов по выбору оптимального состава смеси антител первого порядка было установлено, что наибольшая чувствительность иммуноферментной реакции достигается при адсорбции на поверхности пластика вариантов смесей IV и VI.

Для определения чувствительности всех вариантов тест-систем использовали антиген 200 kDa *B. pseudomallei* 100, который при выполнении данной работы на всех этапах являлся заведомо положительным контрольным образцом.

Следующим этапом работы явился сравнительный анализ чувствительности ТИФМ с контрольным антигеном в условиях варьирования суммарной концентрации антител в смесях МКА.

При подготовке твердой фазы (подложки) нагрузку смеси МКА, состоявшую из равных частей каждого компонента, входившего в композицию, уменьшали до 10 мкг/мл или увеличивали до 50 мкг/мл. Результаты апробации вариантов суммарной нагрузки смеси МКА, сорбируемой на твердой фазе (10, 20 и 50 мкг/мл), выполненной с вариантами смесей IV и VI, свидетельствовал о том, что чувствительность тест-систем, в которых для подготовки твердой фазы использовали растворы МКА с концентрацией 10 и 20 мкг/мл, не имела достоверных отличий. Минимальные концентрации антигена 200 kDa *B. pseudomallei*, выявляемые с помощью этих экспериментальных вариантов иммуноферментных тест-систем достигали значений от 2,5 до 10 мкг/мл в зависимости от варианта ИПК при прочих равных условиях постановки реакции (таблица 15).

Таблица 15 - Сравнительный анализ чувствительности экспериментальной тест-системы при выявлении контрольного антигена

Наименование ИПК	Чувствительность ТИФМ, мкг/мл	
	$3C_6+5C_2+2A_6$	$3C_6+5C_2+Ppm\ II$
$3C_6$	5	10
$5C_2$	2,5	2,5
$6A_{11}$	5	5
$6E_7$	10	10
Примечание - Нагрузка на твердую фазу при подготовке тест-системы составляла 20 мкг/мл по белку; все варианты ИПК применяли в рабочих разведениях		

В случае повышения белковой нагрузки на пластины до 50 мкг/мл чувствительность тест-систем существенно падала, в 2-8 раз в зависимости от использования того или иного варианта иммунопероксидазного конъюгата, его эпитопной направленности.

В результате композиция МКА $3C_6+5C_2+2A_6$ была выбрана в качестве смеси антител первого порядка, сорбируемой на поверхности пластика. При этом выявлены различия в чувствительности реакции в зависимости от примененного ИПК: наиболее эффективной композицией является та, в которой был применен ИПК $5C_2$.

Таким образом, после завершения этапов получения иммунопероксидазных конъюгатов, определения их характеристик по параметрам RZ и рабочего разведения, оптимизации условий подготовки твердой фазы были определены параметры тест-системы для проверки ее чувствительности при работе с различными образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*.

5.4 Изучение диагностических возможностей экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза

После того, как была определена наиболее эффективная композиция ингредиентов тест-системы: АТ₁ (3С₆+5С₂+2А₆) + антиген + АТ₂ (ИПК 5С₂ в рабочем разведении), были выполнены эксперименты, посвященные изучению диагностических возможностей экспериментальной тест-системы иммуноферментной моноклональной на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза.

Обнаружение антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, обеззараженных автоклавированием с помощью экспериментальной тест-системы явилось первым этапом проверки ее диагностических возможностей.

Всего в реакции сэндвич-варианта ТИФМ было проверено 59 штаммов *B. pseudomallei*, обеззараженных автоклавированием. Из них 11 штаммов тест-система обнаруживала с чувствительностью 10⁸ м.к./мл, пять штаммов - с чувствительностью 10⁷ м.к./мл, остальные 43 штамма – с отрицательным результатом. Во взвесах 10 штаммов *B. mallei* антиген 200 kDa не был выявлен. Сводные данные чувствительности экспериментальной тест-системы иммуноферментной для обнаружения антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза не соответствуют рекомендуемым параметрам чувствительности для ТИФМ.

Низкую чувствительность обнаружения антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза можно объяснить тем фактом, что процесс автоклавирования является губительным для эпитопов, расположенных на поверхности микробных клеток. Эпитопы, гомологичные МКА, входящим в состав экспериментальной тест-системы, повреждаются и изменяют свою структуру, таким образом, нарушается их эффективное связывание.

Для повышения чувствительности реакции при использовании экспериментальной тест-системы была выполнена серия опытов по получению конъюгатов МКА-биотин с последующей детекцией реакции стрептавидин-полипероксидазой (Sigma, Германия). По литературным данным, при использовании комплекса МКА-биотин-стрептавидин-полипероксидаза вместо конъюгата МКА-пероксидаза хрена в качестве детектирующих антител, чувствительность иммуноферментной реакции может быть повышена до 600 раз [16; 139]. Система усиления сигнала основана на высоком сродстве биотина (низкомолекулярного растворимого витамина) к стрептавидину (бактериальному белку). Биотин ковалентно связывается непосредственно с моноклональными антителами, затем добавляют стрептавидин. В этом случае образуется целая сеть из молекул стрептавидина, связанного с меченым биотином. Следовательно, происходит многократное усиление сигнала.

Рабочее разведение конъюгата биотин-МКА 5C₂, определенное методом шахматного титрования в двухкомпонентной реакции: контрольный АГ + МКА, меченные биотином с последующим добавлением конъюгата пероксидазы со стрептавидином, возросло в 8 раз, по сравнению с конъюгатом пероксидаза хрена-МКА 5C₂ (1/640 по сравнению с 1/80). Ожидаемого существенного повышения чувствительности реакции, сопоставимой с рекомендуемыми параметрами, не последовало, как при обнаружении контрольного АГ, так и при постановке реакции с ВСЭ, ЭЦА и со взвесями музейных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, обеззараженных автоклавированием. Это связано с тем, что с увеличением оптической плотности в лунках с выявляемым АГ, был зарегистрирован параллельный рост значений контрольных образцов, таким образом, при окончательном расчете чувствительность обнаружения АГ существенно не возрастала.

Вторым этапом проверки диагностических возможностей тест-системы была постановка ТИФМ с образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*, приготовленными по стандартной методике, но из различных партий сырья. В

результате были выявлены различия в чувствительности реакции в зависимости от серии ФЭ *B. pseudomallei* 100. Результаты представлены в таблице 16.

Установлено, что концентрации активного вещества, выявляемые в ТИФМ, колебались в диапазоне от 2,5 до 186 мкг/мл. Результаты доказывают, что разработанная тест-система позволяют выявлять различия в качестве серий образцов гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*. Этот факт требует ретроспективного анализа всех условий накопления бактериальной массы (качество среды выращивания популяции, сроки культивирования, условия обеззараживания микробных клеток) для того, чтобы повысить контроль качества выделяемых образцов антигена и расширить набор критериев оценки содержания антигена 200 kDa в контрольных образцах.

Таблица 16 - Проверка активности различных серий антигена 200 kDa *B. pseudomallei* при использовании экспериментальной тест-системы

Номер серии антигена – ФЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	Минимальная выявляемая концентрация антигена, мкг/мл
	3C ₆ +5C ₂ +2A ₆ 20 мкг/мл
	ИПК 5C ₂
Контрольный антиген	2,5
7	3,7
18	Отрицательно
19	Отрицательно
20	186

В целом, при оценке диагностических возможностей экспериментальной тест-системы для обнаружения антигена 200 kDa *B. pseudomallei* были получены доказательства того, что оптимизированные условия подготовки твердой фазы в сочетании с применением ИПК на основе МКА 5C₂ обеспечивают высокую

чувствительность иммуноферментного анализа, сопоставимую с данными литературы в части прогнозируемой чувствительности ТИФМ при выявлении растворимых антигенов бактерий.

Разработанная тест-система, состоящая из смеси МКА $3C_6+5C_2+2A_6$ на твердой фазе и ИПК на основе МКА $5C_2$, была апробирована для обнаружения антигена 200 kDa в ВСЭ капсулообразующих буркхольдерий II-III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. ceracia*). Результаты проверки представлены на рисунке 5.

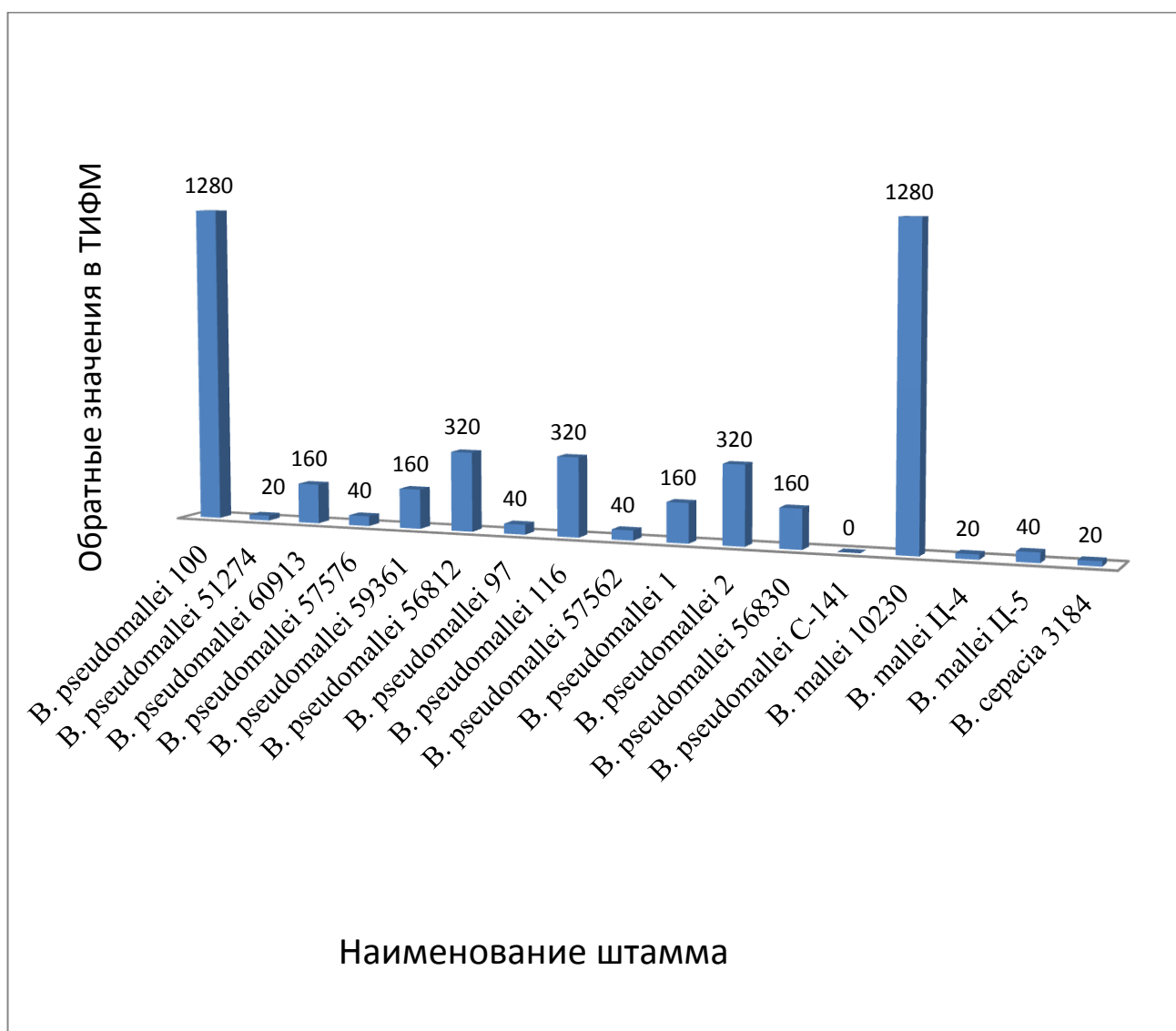


Рисунок 5 - Эффективность обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ патогенных буркхольдерий в ТИФМ, (титр обнаружения контрольного антигена 1/2560, что соответствует 2,5 мкг/мл по белку).

Методика приготовления ВСЭ подразумевает обработку микробных клеток таким образом, что в конечном антигенном препарате содержится весь комплекс антигенов, входящих в состав капсулы, клеточной стенки и антигенов, содержащихся в цитоплазме. Данные, представленные на рисунке 5, позволяют сделать вывод о том, что экспериментальная тест-система может быть использована для анализа водно-солевых экстрактов антигенов с точки зрения содержания антигена 200 kDa.

Интересно отметить, что чувствительность выявления антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов была значительно ниже, чем при выявлении его в ВСЭ гомологичных штаммов. Так, обратные значения титров в ТИФМ при выявлении антигена 200 kDa в ВСЭ *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescence*, *B. gladioli* не превышали 20.

Так как по экспериментальным данным, полученным Anuntagool N. с соавторами в 2000 г., антиген 200 kDa *B. pseudomallei* является гликопротеином, входящим в состав капсулы возбудителя мелиоидоза и в процессе роста микробной клетки секретируется в среду выращивания [44], следующим этапом диссертационной работы явилась оценка чувствительности обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ и ЭЦА патогенных буркхольдерий. Это связано с разницей в методике приготовления образцов антигенов: в отличие от ВСЭ, который содержит полный набор антигенов, присутствующих как на поверхности, так и во внутреннем содержимом микробной клетки, ЭЦА представляет собой смесь АГ, секретируемых микроорганизмом в среду выращивания.

Данные, представленные в таблице 17 и на рисунке 6, демонстрируют тот факт, что содержание антигена 200 kDa в ЭЦА выше, чем в ВСЭ клеток буркхольдерий, что подтверждает данные зарубежной литературы.

Таблица 17 - Чувствительность обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в ВСЭ и ЭЦА патогенных буркхольдерий, (мкг/мл)

Штамм	АГ	Количество АГ, 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.					

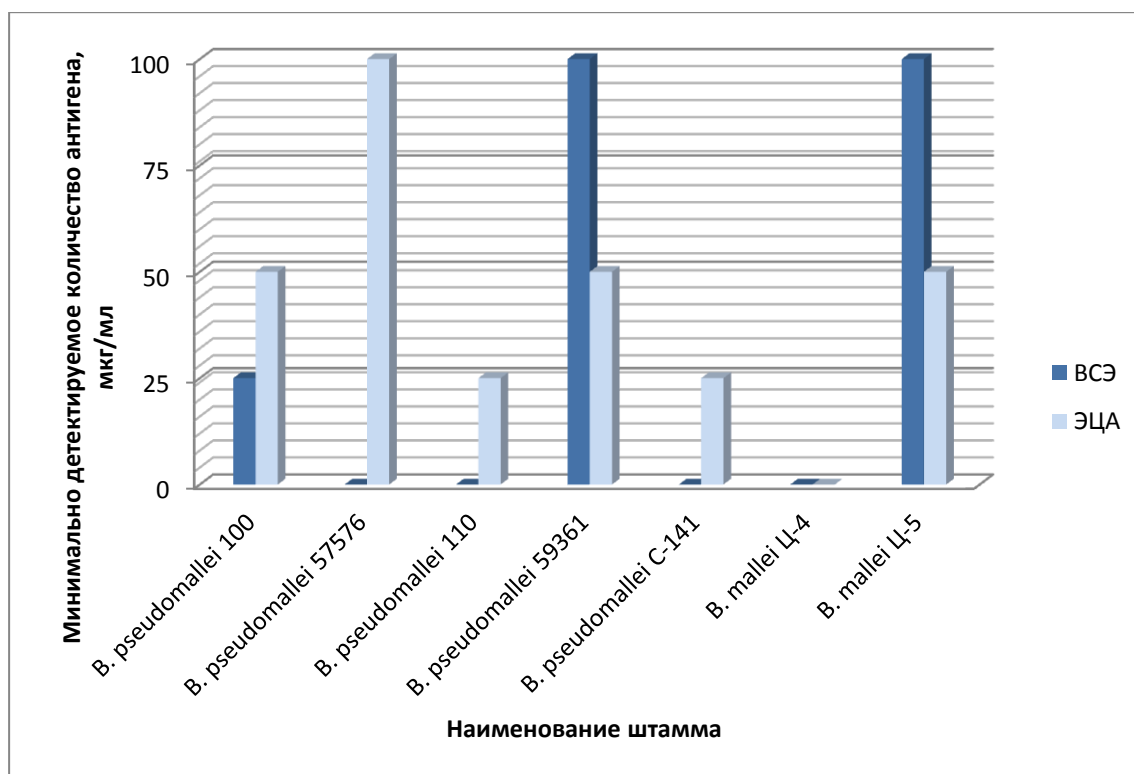


Рисунок 6 - чувствительность выявления антигена 200 kDa *B. pseudomallei* в ВСЭ и ЭЦА возбудителей сапа и мелиоидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы совершенствования иммунодиагностических средств, предназначенных для обнаружения возбудителей особо опасных инфекций не теряют своей актуальности [41, 120, 77].

Известно, что выбор компонентов для изготовления эффективного иммунодиагностического средства напрямую зависит от того, какой антиген является потенциальной мишенью при проведении этапов лабораторной диагностики. Необходимо не только знать подробную антигенную структуру возбудителя, на поиск которого оно будет направлено, но и владеть информацией о возможном наличии перекрестнореагирующих антигенов у возбудителей других инфекционных заболеваний.

Помимо тщательного подбора антигенной мишени, необходимо учитывать и характер сырья для изготовления ингредиентов иммунодиагностических тестов. Так, использование гомогенных по составу и свойствам МКА узкой специфичности в качестве основы иммунодиагностических средств для обнаружения патогенных микроорганизмов является отличительной чертой подавляющего большинства зарубежных производственных линий, выпускающих медицинские иммунобиологические препараты [26].

Создание эффективных средств для иммунодиагностики мелиоидоза, изучение антигенных структур в качестве мишеней для изготовления медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) для быстрого и эффективного выявления *B. pseudomallei* является широким направлением исследования в области данного возбудителя.

Также актуален вопрос дифференциации патогенных и условнопатогенных буркхольдерий (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. gladioli*) и других микроорганизмов, который может быть решен после установления у них видовых, перекрестнореагирующих и общих антигенных комплексов.

Потенциальными мишенями для создания эффективных средств иммунодиагностики мелиоидоза являются основные детерминанты вирулентности *B. pseudomallei*, которые включают в себя экзопротеазы, гемолизины, мембранные белки, капсульные биополимеры, в том числе антиген 8, в состав которого входит гликопротеин 200 kDa, который обладает высокой антифагоцитарной активностью, и протеинов различной массы [19; 20; 21].

МКА в качестве одного из компонентов иммунодиагностического теста для обнаружения возбудителя мелиоидоза начали применять уже с 1987 г., когда появилась публикация об успехах в создании иммуноферментной тест-системы. Данная тест-система была предназначена для обнаружения специфического антигена возбудителя мелиоидоза - экзотоксина в сыворотке крови экспериментальных животных [82].

В настоящее время в диагностических целях чаще всего применяют МКА к экзополисахариду *B. pseudomallei* [138] или поверхностно локализованному антигену капсулоподобного вещества, окружающего клетку *B. pseudomallei* [125], конструируя на их основе препараты и тест-системы для иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализа или используя в реакции агглютинации бактерий.

Помимо межвидовой дифференциации буркхольдерий необходимо выявлять внутривидовые отличия: дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы *B. pseudomallei*, выделяемые из проб клинического материала и объектов внешней среды.

Согласно литературным данным, авирулентные Ara⁺ *B. pseudomallei* изоляты из внешней среды отличаются от вирулентных Ara⁻ клинических изолятов и Ara⁻ изолятов из внешней среды способностью ассимилировать L-арабинозу и отсутствием на их поверхности 200 kDa антигена [44].

Так сформировалось одно из перспективных 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 и идентификации вирулентных штаммов *B. pseudomallei*.

Целью настоящей работы явилось изучение свойств моноклональных иммуноглобулинов к антигену 200 kDa *B. pseudomallei* и оценка эффективности использования панели МКА к этому антигену в качестве основы для изготовления иммунодиагностических препаратов и тест-систем, предназначенных для выявления патогенных буркхольдерий.

В настоящей работе исследована панель моноклональных антител различной эпитопной направленности против антигена 200 kDa, полученная в лаборатории иммунодиагностики и биотехнологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Свойства МКА изучали во взаимодействии с различными антигенами возбудителей мелиоидоза, сапа и гетерологичных микроорганизмов: формамидными, водно-солевыми и экстрацеллюлярными экстрактами микробных клеток, взвесями музейных штаммов, обеззараженными автоклавированием. При этом все растворимые антигенные комплексы были охарактеризованы по химическому составу и антигенному профилю.

На первом этапе исследования были получены данные о суммарном антигенном профиле применявшихся в работе образцов ВСЭ ряда штаммов *B. pseudomallei* и антигенов, экстрагированных формамидом (ФЭ) из *B. pseudomallei* 100. Определено, что в составе всех проб ВСЭ и ЭЦА антигенов присутствовали высокомолекулярные биополимеры с м.м. 200 kDa. Примененная впоследствии 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.

Для получения образцов МКА против антигена 200 kDa *B. pseudomallei*, коллекция гибридных клонов 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*. Затем каждую из гибридом вновь реклонировали для быстрого восстановления функции антителопродукции.

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 [76], 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*), а также образцов среды из лунок, которая также служила источником МКА.

Полученные после этапа накопления *in vivo* данные свидетельствовали о том, что каждая из гибридом является индивидуальной и обладает различной прививаемостью и способностью к асцитообразованию. Наилучшие показатели были зарегистрированы у гибридомы 5C₂.

Далее МКА, использовавшиеся 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).

Исследование образцов МКА в ТИФМ позволило выявить варианты, наиболее активно взаимодействующие с контрольным антигеном (формаимидный экстракт *B. pseudomallei* 100). Образцы иммуноглобулинов, изолированных из АЖ мышей, в ТИФМ обладали более высокой активностью антител, чем МКА, полученные из среды культивирования гибридом. Таким образом, 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 различные данные об удельной активности исследуемых иммуноглобулинов. Также была доказана поверхностная локализация эпитопов на микробной клетке высоковирулентного штамма *B. pseudomallei* 100, 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).

Гомогенность и видовая принадлежность всех образцов МКА была определена при постановке РИД с антивидовой кроличьей сывороткой. Была доказана возможность использования МКА для обнаружения антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза с помощью реакции двойной иммунодиффузии в геле. Так, 7 типов МКА из 10 в разной степени обладали преципитирующей активностью, при этом образцы МКА преципитировали только с ВСЭ *B. pseudomallei* и не обнаруживали антиген 200 kDa в ВСЭ возбудителей сапа и гетерологичных микроорганизмов. Наибольшей специфической активностью в РИД обладали МКА 3C₆ и 6A₁₁, выявляя антиген 200 kDa у 81 % коллекционных штаммов *B. pseudomallei*. 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 два вида буркхольдерий [158].

Привлечение в работу метода иммуноблоттинга с применением антигенов 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, наибольшее количество выявленных эпитопов в составе антигенного профиля образцов ВСЭ и серий ФЭ было установлено у ИПК 5C₂

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. А с помощью изучения конкурентных взаимоотношений МКА были подобраны пары МКА для последующего использования при конструировании экспериментальной тест-системы иммуноферментной.

В задачи диссертационной работы входила оценка возможности изготовления диагностических препаратов и тест-систем иммуноферментных на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза. Основой для последующего изготовления экспериментальных препаратов для МФА и ТИФМ на начальном этапе выполнения данного раздела явились образцы 10 типов МКА.

Для изготовления образцов экспериментальных препаратов иммуноглобулинов флуоресцирующих с флуорохромом были конъюгированы МКА к антигену 200 kDa *B. pseudomallei*, выделенные из асцитической жидкости, с высокой активностью в ТИФМ. Полученные после метки параметры конъюгатов показали, что из 10 типов МКА лишь четыре (3C₆, 5C₂, 5H₁₁, 6A₁₁) подходят для дальнейшего изучения в МФА. Полученные препараты характеризовались достаточно высокими показателями специфической активности в отношении различных штаммов гомологичного вида *B. pseudomallei*.

При изучении перекрестной активности полученных препаратов было установлено, что 3C₆, 5H₁₁ и 6A₁₁ проявили себя как группоспецифичные диагностические средства, не взаимодействующие ни с одним из штаммов, взятых в работу видов гетерологичных микроорганизмов.

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).

Получены данные 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 [122].

Дальнейшая работа была посвящена изучению диагностических возможностей экспериментальных образцов иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных путем воспроизведения регламентированной схемы индикации возбудителей особо опасных инфекций - исследовании биопробного материала [32]. Все четыре варианта экспериментальных препаратов (3C₆, 5C₂, 5H₁₁, 6A₁₁) оказались пригодны для исследования биологического материала, кроме того, исследуя отпечатки через три недели после заражения животных, были получены данные о повышении их диагностической активности, что косвенно свидетельствовало об увеличении на поверхности микробных клеток антигена 200 kDa.

Следующей задачей, которую необходимо было решить в ходе выполнения диссертационной работы, являлась оценка возможности изготовления экспериментальных тест-систем иммуноферментных на основе МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза.

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

В качестве АТ₁ была выбрана смесь из трех МКА (3C₆+5C₂+2A₆), наносимая на поверхность твердой фазы в концентрации 20 мкг/мл. Данная смесь МКА обеспечивала наибольшую чувствительность иммуноферментной реакции.

Для приготовления АТ₂ (иммунопероксидазного конъюгата) – одного из компонентов экспериментальной иммуноферментной тест-системы, предназначенной для выявления антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100, были использованы восемь вариантов МКА, из них семь (3C₆, 4A₁₀, 5C₂, 6A₁₁, 6E₇, 6F₉, 7A₈) подошли по параметрам качества и были лиофилизированы и проверены методом шахматного титрования в ТИФМ.

Сравнительный анализ чувствительности ТИФМ с контрольным антигеном в условиях варьирования суммарной концентрации антител в смесях МКА

показал, что оптимальной белковой нагрузкой на твердую фазу является 20 мкг/мл. Интересно отметить, что в случае повышения белковой нагрузки на пластины до 50 мкг/мл чувствительность тест-систем существенно падала.

После завершения этапов получения иммунопероксидазных конъюгатов и их характеристики, оптимизации условий подготовки твердой фазы была подобрана наиболее эффективная композиция ингредиентов тест-системы: AT_1 ($3C_6+5C_2+2A_6$) + антиген + AT_2 (ИПК $5C_2$ в рабочем разведении).

Первым этапом проверки диагностических возможностей экспериментальной тест-системы явилось обнаружение с ее помощью антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, обеззараженных автоклавированием. Сводные данные чувствительности экспериментальной тест-системы иммуноферментной для обнаружения антигена 200 kDa во взвесах музейных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза не соответствуют рекомендуемым параметрам чувствительности для ТИФМ: из 59 проверенных штаммов *B. pseudomallei*, обеззараженных автоклавированием, тест-система обнаруживала 11 штаммов с чувствительностью 10^8 м.к./мл, пять штаммов - с чувствительностью 10^7 м.к./мл, а остальные 43 штамма – не выявляла. Интересно отметить, что во взвесах 10 штаммов *B. mallei* антиген 200 kDa не был определен. Низкую чувствительность можно объяснить тем фактом, что эпитопы, гомологичные МКА, входящим в состав экспериментальной тест-системы, претерпевают необратимые изменения во время процесса автоклавирования, таким образом, нарушается их эффективное связывание.

Следующим разделом работы явилось изучение чувствительности тест-системы при работе с различными образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei* 100. При оценке диагностических возможностей экспериментальной тест-системы для обнаружения антигена 200 kDa *B. pseudomallei* 100 были получены доказательства того, что оптимизированные условия подготовки твердой фазы в сочетании с применением ИПК на основе МКА $5C_2$ обеспечивают высокую чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении растворимых антигенов бактерий, сопоставимую с данными

литературы. Интересно отметить, что минимальная концентрация активного вещества, выявляемая с помощью тест-системы, составляет 2,5 мкг/мл. 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*.

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 антигена 200 kDa. При этом чувствительность выявления антигена в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов была значительно ниже, чем при выявлении его в ВСЭ гомологичных штаммов.

Разработанная тест-система была использована для выявления антигена 200 kDa *Burkholderia pseudomallei* в ВСЭ и ЭЦА возбудителей сапа и мелиоидоза. 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.

Результаты настоящих исследований подтвердили возможность использования МКА к антигену 200 kDa возбудителя мелиоидоза в качестве ингредиентов для изготовления медицинских иммунобиологических препаратов для эффективного выявления *B. pseudomallei*. Экспериментальные образцы для МФА и ТИФМ проявили себя как диагностические средства, взаимодействующие только с патогенными буркхольдериями и не выявляли ни один из штаммов гетерологичных микроорганизмов. Это можно объяснить сходным строением капсулы патогенных видов *Burkholderia*. Экспериментально доказано, что *B. mallei* способна образовывать капсулу *in vivo*, которая важна для проявления её вирулентности [25; 122; 66], причем капсула *B. mallei* идентична по структуре и составу капсуле *B. pseudomallei* [96].

Анализируя основные пути развития, по которым идут зарубежные фирмы в плане повышения чувствительности ТИФМ, в дальнейшем мы планируем применить новые высокочувствительные способы детекции продуктов ферментативной реакции, которые основаны на использовании сопряженных реакций с применением двух и более ферментов, также можно ожидать существенного повышения чувствительности с помощью современных систем подготовки реагентов, применения методов иммунного захвата [77, 120, 121, 135, 147].

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 ($3C_6+5C_2+2A_6$), сорбируемой на твердой фазе, отобрать высокоактивный иммунопероксидазный конъюгат (ИПК $5C_2$), что обеспечило тест-системе высокую чувствительность выявления антигена 200 kDa, равную 2,5 мкг/мл.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – антиген

Аг 8 – антиген 8

Аг 6 – антиген 6

АЖ – асцитическая жидкость

АТ – антитела

АФ – адъювант Фрейнда

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВСЭ – водно-солевой экстракт

ГХ – гель-хроматография

ДМСО – диметилсульфоксид

з/х – золотистый хомячок

ИПК – иммунопероксидазный конъюгат

ИЭФ - иммуноэлектрофорез

ЛПС – липополисахарид

КЖ – культуральная жидкость

м/св – морская свинка

м.к. – микробная клетка

МКА – моноклональные антитела

м.м. – молекулярная масса

МПА – мясо-пептонный агар

МФА – метод флуоресцирующих антител

НМФА – непрямой метод флуоресцирующих антител

ОП – оптическая плотность

ПМЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

ПС – полисахарид (-ы)

ПХ – пероксидаза хрена

РИД – реакция иммунодиффузии

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

ТИФМ – твердофазный иммуноферментный метод

ФБР – фосфатный буферный раствор

физраствор – физиологический раствор

ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

ФЭ – формамидный экстракт

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЭЦА – экстрацеллюлярные экстракты

Ig – иммуноглобулины

kDa – килодальтон

LD₅₀ – доза патогена, введение которой вызывает гибель 50 % биомоделей

SDS-PAGE – полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А. К., Карпузиди К. С., Акулова М. Ф. Антигенное строение возбудителей сапа и мелиоидоза // В кн. Генетика, биохимия и иммунохимия особо опасных инфекций.-Ростов-на-Дону.-1967.-С.335-339.
2. Гольдин Р. Б., Белецкая Л. В., Крюкова И. Н. и др. Иммунолюминесценция в медицине.-М., 1977. 240 с.
3. Иммунологическая диагностика мелиоидоза / Храпова Н. П., Тихонов Н. Г., Рыбкин В. С. и др. // Мелиоидоз: Сб. науч. тр. – Волгоград, 1995. – С. 57 – 68.
4. Инструкция по проведению контроля на специфическую стерильность препаратов, приготовленных из объектов, содержащих культуры возбудителей сапа и мелиоидоза / Н. Г. Плеханова, Т. В. Сенина, Н. П. Агеева, Е. В. Прохватилова, В. И. Илюхин, рассмотрена Ученым советом ВолгоградНИПЧИ 26.01.2011 г., протокол № 1.
5. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни; пер. с 5-го с англ. изд. Ю. Н. Хомякова, Т. И. Хомяковой. Москва: Бином. Лаб. знаний, 2010.
6. Лабораторная диагностика мелиоидоза (МУ 4.2.2787-10.4.2) / Демина Ю. В., Пакскина Н. Д., Илюхин В. И., Алексеев В. В., Храпова Н. П. и др., // Изданы ФЦГиЭ. – 2011.
7. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В. В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
8. Материалы V симпозиума по мелиоидозу в Таиланде; диагностическая служба United Kingdom; Malnick H. at al., 2007.
9. Методические рекомендации по получению гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигену 200 kDa *Burkholderia pseudomallei*.

Рассмотрены ученым советом и утверждены директором института 28.04.2008 г., протокол № 4.

10. Новицкая И. В., Храпова Н. П. Моноклональные антитела в ранней диагностике и комплексном лечении сапа и мелиоидоза в эксперименте // Акт. пробл. ветеринарии: Матер. междунар. конф. - Барнаул, 1995. - С.89.

11. Онищенко, Г. Г. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза / Г. Г. Онищенко // Вестник Российской Академии Наук : Научный и общественно - политический журнал / гл. ред. Н. А. Платэ.– 2003.– Т.73, N3.

12. Ответные меры системы общественного здравоохранения на угрозу применения биологического и химического оружия. Руководство ВОЗ. ВОЗ 2001.

13. Отчёт о НИР (заключит.) / Волгогр. науч.-исслед. противочум. ин-т.-Волгоград, 1997.-№ ГР 01.9.50. 001333 – 73 с.

14. Отчёт о НИР (заключит.) / ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора.-Волгоград, 2010.-№ ГР 01.2.006 08604– 100 с.

15. Пат. 2004250 Российская Федерация. Способ выделения антигена 6 возбудителя мелиоидоза / Храпова Н. П.; Смирнова В. И.; Пивень Н. Н, Прохватилова Е. В., заявитель и патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; заявл. 04.06.91, опубл. 15.12.93.

16. Пат. 2004251 Российская Федерация. Способ выделения антигена 8 возбудителя мелиоидоза / Храпова Н. П.; Смирнова В. И.; Пивень Н. Н, Прохватилова Е. В., заявитель и патентообладатель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт; заявл. 04.06.91 опубл. 15.12.93.

17. Пат. 2112245 Российская Федерация. Способ и набор для обнаружения антител к вирусу лихорадки долины Рифт в сыворотках животных / Вергун Л. Ю., Вишняков И. Ф.; заявитель и патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии, заявл. 21.06.1996, опубл. 27.05.1998.

18. Пивень Н. Н. Антигенный анализ возбудителей мелиоидоза и сапа в аспектах идентификации, диагностики и патогенности: Дис д. м. н./ – Волгогр. н.-и. (НИ) противочум. ин-т., 1997. – 296 с.

19. Пивень Н. Н. Выделение, очистка и химический состав поверхностного полисахаридного антигенного комплекса возбудителя мелиоидоза / Н. Н. Пивень, В. И. Смирнова // Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Вып. 4 / Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, 1990. - С. 111-117.

20. Пивень Н. Н., Алексеев В. В., Попов С. Ф. и др. Ультраструктурно-иммунохимическое изучение капсулы патогенных буркхольдерий // Журн. микробиол. - 2005. - № 5. - С. 19-24.

21. Пивень Н. Н., Илюхин В. И. Патогенность *Burkholderia pseudomallei* как функция его внеклеточных и поверхностных антигенов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2000. - № 6. – С. 94–99.

22. Пивень Н.Н. (Piven N N), Rybkin V. S., Plekhanova N. G., Zhukova S. I., Viktorov D. V., Avrorova I. V., Demediuk E. A., Drefs N. M., Popov S. F. Immunotropic properties of *Burkholderia pseudomallei* surface and membrane antigens. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2001;1:29-33.

23. Пивень Н. Н., Смирнова В. И., Каплиев В. И., Подзолкова Г. Г., Храпова Н. П. Роль поверхностных антигенов *Pseudomonas pseudomallei* в патогенезе мелиоидоза. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 1991.- № 10. – С. 8–12.

24. Пивень Н. Н., Тимошин В. Б., Алексеев В. В. и др. Способ выявления перекрестнореагирующих антигенов возбудителей мелиоидоза, сапа, чумы, туляремии и туберкулеза // Патент № 2286576.

25. Попов С. Ф. (Popov S. F.), Piven N. N., Kurilov V. I., Dementev I. P. The role of capsule formation in *Burkholderia mallei* for its persistence *in vivo*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2000; 3:73-75.

26. Применение МКА в лабораторной диагностике природноочаговых и труднодиагностируемых инфекций / Храпова Н. П., Тихонов Н.Г., Прохвятилова Е. // Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье: Сб. науч. тр. под ред. Н. Г. Тихонова. – Волгоград, 2000. – С. 318 – 327.

27. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II. Под редакцией А. С. Лабинской, Н. Н. Костюковой и С. М. Ивановой. Москва, Бином, 2010 г., 1152 с.
28. Самойлович, М. П. Совершенствование гибридной технологии и создание моноклональных антител для систем иммуноанализа: автореферат дис...докт. биол. наук : 14.00.36 / Самойлович Марина Платоновна. - Санкт-Петербург, 2006. – 37 с
29. Самыгин В. М., Храпова Н. П., Спиридонов В. А., Степин А. А. Биосинтез антигена 8 в процессе культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei* // Журн. микробиол. - 2001. - № 4. - С. 50-52
30. Санитарные правила 1.3.1285-03 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)" (утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 12 марта 2003 г.).
31. Санитарные правила 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности» (утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 28 января 2008 г.).
32. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство/ Под ред. Г. Г. Онищенко. – М., 2006.
33. Сырова, Н.А. Культивирование гибридом – продуцентов диагностически значимых моноклональных антител к *Francisella tularensis* / Н. А. Сырова, И. В. Терехова, Н. Е. Терешкина и др. // Биотехнология. – 2012. - №2. – С. 66 – 72.
34. Сырова, Н. А. Получение, характеристика и биотехнологические аспекты применения поли- и моноклональных антител к антигенам *Vibrio cholerae* O1 Инаба и Огава: автореф. дис...канд. биол. наук : 03.00.07, 03.00.23 / Сырова Наталия Алексеевна. – Саратов, 2005.-23 с.
35. Ткаченко Г. А., Антонов В. А., Замараев В. С., Илюхин В. И. Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. - 2003.- № 3.- С. 7–11.

36. Федорова, В. А. Теоретико-экспериментальные аспекты изучения белковых и углеводсодержащих антигенов возбудителей чумы и холеры с использованием поли- и моноклональных антител: автореф. дис...докт. мед. наук : 03.00.07, 14.00.36 / Федорова Валентина Анатольевна. - Саратов, 2004. - 41 с.

37. Фельдшера, А. А. Высокоэффективная иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител для выявления антигенов бруцелл / А. А. Фельдшера, Д. А. Эльгорт, М. В. Коноплева и др. // Журн. микробиол. – 2007. - №1. – С. 52 – 57.

38. Хлынцева, А. Е. Разработка комплекса иммунодиагностических тест-систем для обнаружения возбудителя сибирской язвы: автореф. дис... канд. мед. наук : 03.02.03 и 03.01.06 / Хлынцева Анна Евгеньевна. – Оболенск, 2012. – 22 с.

39. Храпова Н. П. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий / Храпова Н. П., Алексеев В. В., Корсакова И. И. // Проблемы особо опасных инфекций, вып. 107, 2011.- С.66-69.

40. Ширяев Д. Т. Мелиоидоз.//М. - Медицина. – 1976.

41. 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, 2000.

42. Яковлева И. В., Свиридов В. В., Титова Н. Г., Храпова Н. П., Липницкий А. В., Фарбер С. М. и др. Моноклональные антитела в дифференциации *Pseudomonas mallei* и *Pseudomonas pseudomallei*. Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол.- 1995.- № 3.-С.14–15.

43. Anuntagool N., Intachote P., Naigowit P., Sirisinha S. Rapid antigen detection assay for identification *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* infection // J. Clin. Microbiol.-1996.-№ 34.-P.975–976.

44. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lypopolysaccharide 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
45. Ashdown L., Guard R. The prevalence of human melioidosis in Northern Queensland // Amer. J. Trop. Med. Hyg.- 1984.- V.33.- N 3.-P.474-478.
46. Ashdown L. R. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and sub-clinical melioidosis // J. Clin. Microbiol.- 1981.- № 14.- P. 361–364.
47. Atkins, T., R. Prior, K. Mack, P. Russell, M. Nelson, J. Prior, J. Ellis, P. C. Oyston, G. Dougan, and R. W. Titball Characterisation of an acapsular mutant of *Burkholderia pseudomallei* identified by signature tagged mutagenesis // J. Med. Microbiol. – 2002.- № 51.- P. 539–547.
48. 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.
49. Blanc G., Delage B, Martin L. Etude comparative de caractères biochimiques et sérologiques du bacille Whitmore et de bacille pyocyanique // Ann. Inst.Pasteur. - 1943. - V.69. - N 3-4. - P.65-74.
50. Bode L., Beutin L., Köhler H. Nitrocellulose-enzyme-linked immunosorbent assay (NC-ELISA) – a sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. // J. Virol. Methods. – 1984. Vol.8(1-2).- P. 111-121.
51. Boulnois G. J., Roberts I. S., Hodge R., Hardy K. R., Jann K. B., Timmis K. N. Analysis of the K1 capsule biosynthesis genes of *Escherichia coli*: definition of three functional regions for capsule production. Mol Gen Genet.- 1987.- № 208.- P. 242-246.
52. Brett, P. J., and Woods, D. E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis // Acta Trop. – 2000.- Vol. 74. – P. 201–210.

53. Brett, P.J., D. Deshazer and D.E. Woods Characterization of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia pseudomallei*-like strains // Epidemiol Infect.- 1997.- V. 118.- P. 137-148.
54. Brett, P.J., D. DeShazer and D.E. Woods. 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species // Int J. Syst. Bacteriol.-V. 48.- P. 7-20.
55. Brown, N. F., et al., Adherence of *Burkholderia pseudomallei* cells to cultured human epithelial cell lines is regulated by growth temperature // Infection and Immunity.- 2002.- V.70(2).- P. 974-980.
56. Chambon L., Fournier J. Constitution antigenique de *M. pseudomallei*. II. Demonstration de l'ensistence des antigenes M, K et O stude de leurs propucties immunologiques //Ann. Inst. Pasteur. - 1956. - T.91. - N 4. - P. 472-485.
57. Chantratita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Cheng A. C., Chierakul W., Day N. P. et al. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis // Clin Vaccine Immunol.- 2007.-V. 14.- P. 110-113.
58. Cheng A. C., Currie B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management // Clin Microbiol Rev.-2005.- Vol.18.- P. 383–416.
59. Cheng A. C., O'Brien M., Freeman K., Lum G., Currie B. J. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in northern Australia // Am J Trop Med Hyg.- 2006.- V. 74.- P. 330-334.
60. Chieng S., Carreto L., Nathan S. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional adaptation in macrophages // BMC Genomics.-2012.- V.13.- P. 328.
61. Cooper A., Williams N. L., Morris J. L., Norton R. E., Ketheesan N., Schaeffer P. M. / ELISA and immuno-polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of melioidosis // Diagn Microbiol Infect Dis.-2013.- V. 75(2).-P. 135-138.
62. Cravitz L., Miller W. Immunologic studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*. I. Serological relationships between *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* // J.Infect. Dis. - 1950. - V.86. - P. 46-51.

63. Cuccui J, Milne T. S., Harmer N., George A. J., Harding S. V., et al. Characterization of the *Burkholderia pseudomallei* K96243 capsular polysaccharide I coding region // Infect Immun.- 2012. - V. 80.- P. 1209–1221.
64. Currie B. J., D. A. Fisher, N. M. Anstey and S. P. Jacups. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation // Trans R Soc Trop Med Hyg.- 2000.-Vol. 94.- P. 301-304.
65. Currie, B. J., D. A. Dance, et al. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update // Trans R Soc Trop Med Hyg.- 2008.-V. 102.- P.1-4.
66. DeShazer D., Waag D. M., Fritz D. L., Woods D. E. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant // Micro Pathog.- 2001.- V. 30. –V. 253-269.
67. DeShazer, D., P. J. Brett, and D. E. Woods The type II O-antigenic polysaccharide moiety of *Burkholderia pseudomallei* lipopolysaccharide is required for serum resistance and virulence // Mol. Microbiol. – 1998.- V. 30.- P. 1081–1100.
68. DeShazer, D., P. J. Brett, R. Carlyon and D.E. Woods Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OTI 82: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene // J Bacteriol. – 1997.- V. 179.- P. 2116-2125.
69. Dharakul T., Songsivilai S., Anuntagool N., Chaowagul W., Wongbunnate S., Intachote P. et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1997.- V. 56(4).- P. 418–423.
70. Dodin A., Fournier J. Antigenes precipitants et antigenes agglutinants de *Ps. pseudomallei* (B. de Whitmore). I. Complexe thermostable et complexe thermostable. Typage serologique //Ann. Inst. Pasteur. - 1970. - V.119.- N 2. - P.211-221.
71. Dodin A., Fournier J. Antigenes precipitants et agglutinants de *Ps. pseudomallei* (bacille de Whitmore). II. Mise en évidence d'antigenes precipitants

communs a *Y.pestis* a *Ps. pseudomallei* // Ann. Inst. Pasteur.- 1970.- V.119.- N 6.- P.738-744.

72. Essex-Lopresti, A. E., J. A. Boddey, R. Thomas, M. P. Smith, M. G. Hartley, T. Atkins, N. F. Brown, C. H. Tsang, I. R. Peak, J. Hill, I. R. Beacham, and R. W. Titball A type IV pilin, PilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence in vivo // Infect. Immun.- 2005.-V. 73.- P. 1260–1264.

73. Fournier J. Les antigenes thermostables de *Pseudomonas pseudomallei* et de *Malleomyces mallei* et leurs communautes //Ann. Inst. Pasteur. - 1967. - V.112. - P.93-104.

74. Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Pages, J. et al. 1983. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the 2 subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase // J. Immunol. Methods.- 1983.- V. 60.- P. 351–358.

75. Gilmore G., Barnes J., Ketheesan N., Norton R. Comparison of the use of *Burkholderia thailandensis*, *B. cepacia* and *B. pseudomallei* antigens in indirect haemagglutination assay for melioidosis. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 231.

76. Goding, J. W. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice Academic Press Inc.: London, 315 p.

77. Hara Y., Chin C. Y., Mohamed R., Puthuchear S. D., Nathan S. Multiple-antigen ELISA for melioidosis-a novel approach to the improved serodiagnosis of melioidosis // BMC Infect Dis.- 2013.- V. 13.- P. 165.

78. Haraga, A., T. E. West, M. J. Brittnacher, S. J. Skerrett and S. I. Miller, *Burkholderia thailandensis* as a model system for the study of the virulence-associated type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei* // Infect Immun.- 2008.- V. 76.- P. 5402-5411.

79. Heiss C., Burtnick M. N., Wang Z., Azadi P., Brett P. J. Structural analysis of capsular polysaccharides expressed by *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // Carbohydrate research.- 2012.- V. 349.- P. 90–94.

80. Holden, M. T. G., Titball, R. W., Peacock, S. J., Cerdeno-Tarraga, A. M., Atkins, T., Crossman, L. C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K. & other authors Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei* // Proc.Natl.Acad.Sci.USA.- 2004.- V. 101.- P. 14240–14245.
81. Inglis, T. J., A. Merritt, et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei* // J Clin Microbiol.- 2005.-V. 43(5).-P. 2201-2206.
82. Ismail G., Embi M. N., Omar O., Allen J. C., Smith C. L., A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin // J. Clin. Microbiol. - 1987. -№ 23.- P. 353–357.
83. Jones, A. L., T. J. Beveridge and D. E. Woods Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* // Infect Immun. -1996.- Vol. 64.- P. 782-790.
84. Kaestli, M., M. Mayo, et al. Landscape changes influence the occurrence of the melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei* in soil in northern Australia // PLoS Negl Trop Dis.- 2009.-V. 3(1). – P. 364.
85. Kawahara, K., S. Dejsirilert and T. Ezaki Characterization of three capsular polysacharides produced by *Burkholderia pseudomallei* // FEMS Microbiol Lett.- 1998.- V. 169.- P. 283-287.
86. Knirel, Y. A., N. A. Paramonov, A. S. Shashkov, N. K. Kochetkov, R. G. Yarullin, S. M. Farberand V. I. Efremenko Structure of the polysaccharide chains of *Pseudomonas pseudomallei* lipopolysaccharides // Carbohydr Res.- 1992.- V. 233.- P. 185-193.
87. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature. – 1970.- Vol. 227.- P. 680-685.
88. Lapeyssonie L. Mise au point; bacille de Whitmore et melioidose //Ann. Inst. asteur. - 1958. - V.95. - P.334-342.
89. Lazdunski, A. M., Ventre, I., and Sturgis, J. N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria // Nat Rev Microbiol.- 2004.- V. 2.-P. 581-592.

90. Lee, M. A., and Y. Liu Sequencing and characterization of a novel serine metalloprotease from *Burkholderia pseudomallei* // FEMS Microbiol.Lett. – 2000.- V. 192.- P. 67–72.
91. Leelarasamee, A. Recent development in melioidosis // Curr Opin Infect Dis.- 2004.- V. 17(2).- P. 131-136.
92. Legroux R., Blanc G. Nouveaux elements de rapprochement des bacillus de la morve de Whitmore et pyocyanique //Ann. Inst. Pasteur. - 1943. - V.69. - P.49-52.
93. Legroux R., Genevray J. Etude comparative entre le bacille de Whitmore et le bacille pyocyanique //Ann. Inst. Pasteur.-1933. -V.51.-P.249-264.
94. Limmathurotsakul D., Peacock S. J. Melioidosis: a clinical overview // British medical bulletin.- 2011.- V. 99.- P. 125–139.
95. Limmathurotsakul, D., V. Wuthiekanun, et al. *Burkholderia pseudomallei* is spatially distributed in soil in northeast Thailand // PLoS Negl Trop Dis.- 2010.- V. 4(6): e694.
96. Lopez, J. et al., Characterization of experimental equine glanders // Microbes Infect.- 2003.-V. 5(12).- P.1125-31.
97. Macario A. J. L., Conway de Macario E Monoclonal antibodies against bacteria / Ed. by A.J.L Macario and Conway de Macario E // New Yourk Academic Press.- 1985. – Vol. 1. – P. 17-33.
98. Mack, P. and R. Nambiar. Multiple splenic abscesses following *Pseudomonas* sepsis // Ann Acad Med Singapore. -1989. Vol. 18.- P. 311-312.
99. Mahenthiralingam, E., A. Baldwin, et al. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology // J Appl Microbiol.- 2008.- V. 104(6).-P. 1539-1551.
100. Masoud, H., M. Ho, T. Schollaardt and M.B. Perry Characterization of the capsular polysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei* // J Bacterial.- 1997.- V. 179.- P. 5663-5669.
101. Methods in Enzymology: Volume 184. John N. Abelson, Melvin I. Simon, Meir Wilchek, Edward A. Bayer, eds. San Diego, CA, USA. Academic Press, 1990.

102. Meyer T. S., Lamberts B. L. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. // Biochim. Biophys. Acta. – 1965. Vol. 107(1).- P. 144-145.
103. Moore, R. A., D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman and D. E. Woods. 1999. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei* // Comment in Antimicrob Agents Chemother.- 1999.-V. 43(9).- P. 2332.
104. Nakane P. K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. - 1974. – V. 22, № 12. – P. 1084 – 1091.
105. Niyompanich S¹, Jaresitthikunchai J², Srisanga K¹, Roytrakul S², Tungpradabkul S¹ Source-Identifying Biomarker Ions between Environmental and Clinical *Burkholderia pseudomallei* Using Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) // PLoS One. 2014 Jun 10;9(6):e99160.
106. Norazah A., Rohani M.Y., Chang P.T., Kamel A.G. Indirect hemagglutination antibody against *Burkholderia pseudomallei* in normal blood donors and suspected cases of melioidosis in Malaysia // Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.- 1996.-V. 27(2).- P. 263–566.
107. O'Brien M., Freeman K., Lum G., Cheng A. C., Jacups S. P., Currie B. J. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity // J Clin Microbiol.- 2004.- V. 42.- P. 2239-2240.
108. Ornstein L. and Davis B. J. Disc electrophoresis-I: Background and theory. // Ann. NY Acad. Sci. – 1964. Vol.121:321-349.
109. Perry, M. B., L. L. MacLean, T. Schollaardt, L. E. Bryan and M. Ho Structural characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei* // J Infect Immun.-1995.- V. 63.- P. 3348-3352.
110. Pier G. B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity // Int J Med Microbiol.- 2007.- V. 297.- P. 277–295.

111. Price E. P., Sarovich D. S., Mayo M., Tuanyok A., Drees K. P., et al. Within-host evolution of *Burkholderia pseudomallei* over a twelve-year chronic carriage infection // MBio.- 2013.- V. 4.
112. Protein measurement with the Folin phenol reagent/ O.H. Lowry, J.Bid.Chem.-1951.-Vol.193.-P.265-275.
113. Pruksachartvuthi, S., N. Aswapokee and K. Thankerngpol. 1990. Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes // J Med Microbiol. Vol. 31. P. 109-114.
114. Puthucheary S. D., Anuar A. S., Tee T. S. *Burkholderia thailandensis* whole cell antigen cross-reacts with *B. pseudomallei* antibodies from patients with melioidosis in an immunofluorescent assay // Southeast Asian J Trop Med Public Health.- 2010.- V. 41.- P. 395-400.
115. Puthucheary S. D., Vadiveleu D. J., Cei C. C., KumThong W., Ismail J. Electromicroscopic demonstration of extracellular structure of *Burkholderia pseudomallei* // Am J Trop Med Hyg.- 1996.- V. 54.- P. 313-314.
116. Puthucheary S. D. Melioidosis in Malaysia // Med J Malaysia.- 2009.- V. 64.- P. 266-274.
117. Puthucheary S. D., Vadivelu J. Human melioidosis / Singapore University Press. 2002. - 95 p
118. Qazi, O., Prior, J. L., Judy, B. M., Whitlock, G. C., Kitto, G. B., Torres, A. G., Estes, D. M., and Brown, K. A. Sero-characterization of lipopolysaccharide from *Burkholderia thailandensis* // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.- 2008.- V. 102.- P. 58–60.
119. Raetz C. R, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // AnnuRevBiochem.- 2002.- V. 71.- P. 635–700.
120. Rammaert B., Goyet S., Tarantola A. Melioidosis requires better data sharing for improved diagnosis and management in the Mekong region // Am J Trop Med Hyg.-2014 Feb.- Vol. 90(2). – P. 383.
121. Raymond L. Houghton, Dana E. Reed, Mark A. Hubbard, Michael J. Dillon, Hongjing Chen, Bart J. Currie, Mark Mayo, Derek S. Sarovich, Vanessa

Theobald, Direk Limmathurotsakul, Gumphol Wongsuvan, Narisara Chantratita, Sharon J. Peacock, Alex R. Hoffmaster, Brea Duval, Paul J. Brett, Mary N. Burtnick, and David P. AuCoin Development of a Prototype Lateral Flow Immunoassay (LFI) for the Rapid Diagnosis of Melioidosis // PLoS Negl Trop Dis.- Mar 2014.- Vol. 8(3): e2727.

122. Reckseidler, S. L., D. DeShazer, P. A. Sokol and D. E. Woods. 2001. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant // Infect Immun.- V. 69.- P. 34-44.

123. Reckseidler-Zenteno, S. L., R. DeVinney, and D. E. Woods The capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* contributes to survival in serum by reducing complement factor C3b deposition // Infect. Immun.-2005.- V. 73.- P. 1106–1115.

124. Richardson L. J., Kaestli M., Mayo M., Bowers J. R., Tuanyok A., et al. Towards a rapid molecular diagnostic for melioidosis: Comparison of DNA extraction methods from clinical specimens // Journal of microbiological methods.- 2012.- V. 88.- P. 179–181.

125. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S., Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis // Am. J. Trop. Med. Hyg.-1995.-№ 52.-P.231–235.

126. Sarkar-Tyson M, Thwaite J. E., Harding S. V., Smither S. J., Oyston P. C., et al. Polysaccharides and virulence of *Burkholderia pseudomallei* // J Med Microbiol.- 2007.-V. 56.-P. 1005–1010.

127. Scott A. E., Burtnick M. N., Stokes M. G., Whelan A. O., Williamson E. D., Atkins T. P, Prior J. L., Brett P. J. *Burkholderia pseudomallei* capsular polysaccharide conjugates provide protection against acute melioidosis // Infect Immun.-2014 [Epub ahead of print].

128. Segrest J. P., Jackson R. L., Andrews E. P., Marchesi V. T. Human erythrocyte membrane glycoprotein: a re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1971. Vol.44(2).- P. 390-395.

129. Shields R., Burnett W.: Determination of protein bound carbohydrate in serum by modified anthrone method // *Analyt. Chem.*- 1960.- V. 32.- P. 885–886.
130. Sim B. M., Chantratita N., Ooi W. F., Nandi T., Tewhey R., et al. Genomic acquisition of a capsular polysaccharide virulence cluster by non-pathogenic *Burkholderia* isolates // *Genome Biol.*- 2010.- V. 11: R89.
131. Singha H., Malik P, Goyal S. K., Khurana S. K., Mukhopadhyay C, Eshwara VK, Singh RK Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines // *ScientificWorldJournal.*- 2014 Feb 3.-2014.-469407.
132. Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun V., Puthucheary S.D., Vadivelu J. et al. Antigenic differences between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* // *Microbiol. Immunol.*- 1998/- V. 42(11).- P. 731–737.
133. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T., Ekpo P., Wongratanacheewin S., Naigowit P. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis // *Acta Trop.*- 2000.- V. 74.- P. 235–245.
134. Smith M. D., Angus B. J., Wuthiekanun V., White N. J. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei* // *Infect. Immun.*- 1997.- V. 65.- P. 4319–4321.
135. Sorenson A. E., Williams N. L., Morris J. L., Ketheesan N., Norton R. E., Schaeffer P. M. / Improved diagnosis of melioidosis using a 2-dimensional immunoarray // *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Nov.- V. 77(3).- P. 209-215.
136. Steinmetz I., Rohde M., Brenneke B. Purification and characterisation of an exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* // *Infect Immun.* – 1995. - № 63.– P.3959–3965.
137. Steinmetz I. Reganzerowski A., Brenneke B., Haussler S., Simpson A., White N.J. Rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* by latex agglutination based on an exopolysaccharide-specific monoclonal antibody // *J. Clin. Microbiol.*- 1999.- V. 37(1). -P. 225–228.

138. Steinmetz I., M. Nimtz, V. Wray, S. Haussler, A. Reganzerowski and B. Brenneke Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei* // Acta Trop.-2002.- V. 74.- P. 211-214.

139. Sugiyama K., Hoshino N., Tatsumi H., Fukuda S. Complexes containing crosslinked avidin, analytical method with the use of crosslinked avidin and analytical reagents and kits. US Patent 6787325. September 7, 2004, Avidin-Biotin Technology.

140. Suppiah J., Thimma J. S., Cheah S. H., Vadivelu J. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia* genus and to differentiate the species in clinical specimens // FEMS Microbiol Lett.- 2010.- V. 13(1).- P. 9–14.

141. Tandhavanant S., Wongsuvan G., Wuthiekanun V., Teerawattanasook N., Day N. P., et al. Monoclonal antibody-based immunofluorescence microscopy for the rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* in clinical specimens // Am J Trop Med Hyg.- 2013.-V. 89.- P. 165–168.

142. The T.H., Feltkamp T.E.W. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation // Immunology. -1970.- V.18.- P. 865-873.

143. Thepthai C, T. Dharakul, S. Smithikarn, S. Trakulsomboon, S. Songsivilai. Differentiation between non-virulent and virulent *Burkholderia pseudomallei* with monoclonal antibodies to the Ara+ or Ara- biotypes // Am. J. Trop. Med. Hyg.- 2001.- V. 65(1).- P. 10–12.

144. Thepthai C., Smithikarn S., Sukswan M., Songsivilai S., Dharakul T. Serodiagnosis of melioidosis by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using a lipopolysaccharide-specific monoclonal antibody // Asian Pac J Allergy Immunol. - 2005 Jun-Sep; Vol.23 (2-3).- P. 127-132.

145. TiyaWisutsri R., Peacock S. J., Langa S., Limmathurotsakul D., Cheng A. C., Chierakul W. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay // J. Clin. Microbiol.- 2005.- V. 43(9).- P. 4872–4874.

146. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. -Vol. 76(9).- P. 4350–4354.
147. Trivedi P.¹, Tuteja U., Khushiramani R., Reena J., Batra HV Development of a diagnostic system for *Burkholderia pseudomallei* infections // World J Microbiol Biotechnol.- 2012.- V. 28(7). –P. 2465-2471.
148. Tsang V., Peralia J., Simons A. Enzyme-linked immuno-electrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. // Methods in Enzimol. – 1983. Vol. 92. P. 377-391.
149. Use of monoclonal antibody to increase sensitivity and specificity in quantitative immunodiffusion assay/ Glodel M., Montgomery R. R., Smith C.G. et al. // J. Immunol. Meth.- 1982.-Vol.48, N1.-P. 13-22.
150. Valade, E., F. M. Thibault, Y. P. Gauthier, M. Palencia, M. Y. Popoff, and D. R. Vidal The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease // J. Bacteriol.-2004.-V. 186.- P. 2288–2294.
151. Verge J., Pairemaure O. Morve et melioidose. La reaction de fixation, dans la morve, au mogen de l'antigene a Bacillus Whitmore //C.R.Soc. Biol. - 1928. - V.99 - P.182-183.
152. Waag D. M, DeShazer D. Glanders: new insights into an old disease Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism // 1st ed Humana Press, Inc, Totowa, NJ.- 2004.- P. 209–237.
153. Warawa, J., and D. E. Woods Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model // FEMS Microbiol.Lett.- 2005.- V. 242.- P. 101–108.
154. Wardi A. H., Allen W. S. Alcian blue staining of glycoproteins. // Anal. Biochem. – 1972.- Vol. 48(2).-P. 621-623.
155. Wiersinga W. J., Currie B. J., Peacock S. J. Melioidosis. // N Engl J Med.- 2012.- V. 367.-P. 1035–1044.

156. Wiersinga, W. J., van der Poll, T., White, N. J., Day, N. P., and Peacock, S. J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* // Nat Rev Microbiol.- 2006 Apr; Vol.4(4).- P. 272-282.
157. Wongratanacheewin S., Tattawasart U., Lulitanond V., Wongwajana S., Sermswan R., Sookpranee M., Nun-tirooj K., Characterization of *Pseudomonas pseudomallei* antigens by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. Southeast Asian // J. Trop. Med. Pub. Hlth. – 1993. - № 24.-P.107–113.
158. Wuithiekanun V., Anuntagool N., White N.J. et al. Short report: a rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*/ // Am. J. Med. Hyg.- 2002.- V. 66, № 6.- P. 759-761.
159. Wuthiekanun V., Smith M.D., Dance D.A., Walsh A.L., Pitt T.L., White N. J. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J. Med. Microbiol. 1996; 45:408–12; 24.
160. Wuthiekanun V., Amornchai P., Chierakul W., Cheng A.C., White N.J., Peacock S.J., Day N.P. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG rapid cassette test kits for diagnosis of melioidosis in an area of endemicity. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(8):3435–3437.
161. Zhang S., Feng S. H., Li B., Kim H-Y, Rodriguez J, et al. *In vitro* and *in vivo* studies on monoclonal antibodies with prominent bactericidal activity against *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* // Clin Vaccine Immunol.- 2011.
162. Zhao J., Liu Z., Ma C., Deng D. A study on pathogen antigen and serodiagnosis of Malleus and melioidosis. Wei Sheng Wu Hsueng Pao.- 1990.- V. 30(1).- P. 63–69.