

11. Abdollahi S., Ramazanzadeh R., Khiabani Z.D. et al. Epidemiological and Inducible Resistance in Coagulase Negative Staphylococci. *Glob. J. Health Sci.* 2015, 8(4): 109-119.
12. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
13. Katayama J., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1549-1555.
14. Livorsi D.J., Arif S., Garry P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal real-time PCR: a predictive tool for contamination of the hospital environment. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* 2015 Jan; 36(1): 34-39.

Поступила 07.06.19

Контактная информация: Орлова Оксана Анатольевна, д.м.н.,  
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, р.т. (499)193-30-01

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Г.В.Кужлина, Г.Д.Елагин, Д.В.Печенкин, О.О.Фоменков, А.В.Еремкин, А.А.Кытманов, С.А.Шурупов, С.С.Ипатов*

### **ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ BURKHOLDERIA MALLEI И BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI**

Филиал 48 Центрального НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Киров

*Цель.* Получение гибридом, продуцирующих специфические моноклональные антитела к антигенам *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. *Материалы и методы.* В работе использовали микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала 48 ЦНИИ Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c. Гибридизацию В-лимфоцитов и миеломных клеток SP2/0-Ag14 проводили по методике G.Kohler и С.Milstein в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger. Исследование специфической активности иммунных сывороток, супернатантов гибридом и асцитических жидкостей, а также оценку диагностических возможностей моноклональных антител проводили методом иммуноферментного анализа. *Результаты.* В результате проведенных гибридизаций получены и охарактеризованы гибридомы-продуценты моноклональных антител к специфическим антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами при многократном пассировании *in vitro* и *in vivo*. Получены асцитические жидкости, из которых выделены иммуноглобулины. Проведен выбор антител, обеспечивающих наибольшую чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа. *Заключение.* Моноклональные антитела, продуцируемые полученными гибридомами, планируется использовать для конструирования иммунобиологических препаратов.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 78—82

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, гибридомы, моноклональные антитела

## MANUFACTURING OF HYBRIDOMAS, PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST *BURKHOLDERIA MALLEI* AND *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ANTIGENS

Branch of the 48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russia

*Aim.* Obtaining hybridomas, stable producing specific monoclonal antibodies against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* antigens. *Materials and methods.* The microbial cultures from State Collection of Microorganisms from the Branch of 48 CSRI of the Defense Ministry of Russian Federation (Kirov) and BALB/c mouse were used in research. Hybridization of B lymphocytes with SP2/0-Ag14 myeloma cells was performed by G.Kohler and C.Milstein procedure in De St. Fazekas and D.Scheidegger modification. The specific activity of immune sera, hybridoma supernatants, ascites and evaluating the diagnostic capabilities of monoclonal antibodies was studied by ELISA. *Results.* Hybridomas, producing monoclonal antibodies against causative agents of glanders and melioidosis antigens, were obtained and characterized. Obtained hybridomas are active and stable antibody producers after repeated *in vitro* and *in vivo* passaging. Immunoglobulins from obtained ascites were isolated. Antibodies provided the greatest sensitivity and specificity were selected. *Conclusion.* Monoclonal antibodies, producing by obtained hybridomas may be used for creating of immune biological tests.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 78–82

Key words: *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, hybridomas, monoclonal antibodies

Среди представителей рода *Burkholderia* особое место занимают *B. mallei* и *B. pseudomallei*, относящиеся к микроорганизмам второй группы патогенности. В национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, Великобритании, США и Канады возбудители сапа и мелиоидоза входят в ведущие группы по степени опасности для человека [2]. В настоящее время заболевания, вызываемые *B. mallei* и *B. pseudomallei*, продолжают регистрировать в Турции, Иране, Объединенных Арабских Эмиратах, Афганистане, Индии, Китае, Монголии, на Филиппинах, а также в странах Африки и Латинской Америки [4]. Заболеваемость сапом и мелиоидозом среди людей носит, в основном, спорадический характер [2]. Актуальность создания эффективных средств диагностики сапа и мелиоидоза определяется реальной угрозой их заноса на территорию России из эндемичных стран в связи со значительным ростом транспортных связей, возросшими объемами грузоперевозок и пассажиропотоков, увеличением числа туристических поездок российских граждан в эндемичные регионы, привлечением иностранной рабочей силы и незаконной миграцией населения.

На сегодняшний день существующие методы обнаружения патогенных буркхольдерий оказываются недостаточно эффективными для экспресс-диагностики, а идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза по-прежнему является трудоемкой задачей. Традиционная лабораторная диагностика, направленная на выделение чистой культуры возбудителя с последующей ее идентификацией, позволяет дать положительный ответ лишь через 36-48 часов. Классические серологические методики дают более быстрые результаты, но обладают относительно низкой чувствительностью и недостаточной специфичностью из-за возможных перекрестных реакций с гетерологичными видами и антигенной вариабельности штаммов гомологичных микроорганизмов. В настоящее время для детекции различных патогенов все более активно используют полимеразную цепную реакцию. Однако опыт зарубежных исследователей свидетельствует, что молекулярно-биологические методы обнаружения патогенных буркхольдерий целесообразно включать в качестве подтверждающих тестов в схему лабораторной диагностики [5].

Многолетний опыт лабораторной диагностики различных инфекционных заболеваний свидетельствует о том, что иммунологические методы исследования в силу своей достаточно высокой чувствительности и специфичности, относительной методической простоты и невысокой себестоимости являются эффективным способом решения задач обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов. Создание современных иммунобиологических средств, предназначенных для выявления возбудителей опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы, невозможно без высокоактивных и специфичных антител. Такими свойствами обладают моноклональные антитела (МКАТ), которые получают с использованием гибридной технологии. Применение МКАТ для создания иммунобиологических средств позволяет значительно повысить их диагностические показатели.

Препараты для иммунизации мышей линии BALB/c готовили из смеси суспензий инактивированных культур *B. mallei* штаммов Ц-5, 11, 10230 и *B. pseudomallei* штаммов С-141, Dalat, Duc-V. Иммунизацию осуществляли подкожно в дозах 2 млрд, 4 млрд, 8 млрд и 16 млрд микробных клеток (м.к.) на животное. Специфическую активность иммунных сывороток определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

Животным с наибольшим уровнем сероконверсии вводили бустер-дозу (15 млрд м.к.) антигенного препарата. На четвертые сутки с момента бустерной инъекции селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии. Процедуру слияния В-лимфоцитов селезенки мыши и клеток миеломы SP2/0-Ag14 проводили по методике G.Kohler и C.Milstein [6] в модификации De St.Fazekas и D.Scheidegger [3]. Клонирование гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений из расчета одна клетка на лунку. Иммунологический скрининг гибридных культур и их клонов проводили, начиная с 10 суток после гибридизации, трижды с интервалом три дня методом непрямого ИФА.

С целью изучения культуральных свойств гибридом готовили разведения культур от 200 тыс. клеток в 1 мл до 6,25 тыс. клеток в 1 мл и засеивали ими лунки 24-луночного планшета в объеме 1 мл. За минимальную посевную концентрацию принимали разведение, при котором на пятые сутки не наблюдали гибели клеток.

Изучение секреторных свойств полученных клонов проводили методом непрямого ИФА. Для исследования использовали культуральные и асцитические жидкости гибридом-продуцентов. Культуральные жидкости получали от гибридных культур в логарифмической фазе роста. Для получения асцитических жидкостей в брюшную полость мышей линии BALB/c вводили гибридные клетки в количестве от 1 млн до 2 млн на животное. В случае развития у мышей асцитических опухолей на 15-20 сутки производили забор перитонеального экссудата. Иммуноглобулины из асцитической жидкости выделяли путем осаждения раствором сульфата аммония. Фракционированные антитела очищали методом ионообменной хроматографии [1]. Из очищенных иммуноглобулинов готовили конъюгаты с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) по методике периодатного окисления [7].

С целью обоснованного выбора МКАТ, позволяющих «сэндвич»-методом ИФА выявлять микробные культуры возбудителей сапа и мелиоидоза, был проведен анализ различных сочетаний антител в качестве сенситина и в составе конъюгата. Для этого планшеты сенсibilизировали очищенными иммуноглобулинами в концентрации 20 мкг/мл. В качестве положительного контроля использовали культуры *B. mallei* штамма Ц-5 и *B. pseudomallei* штамма С-141 в концентрации 5 млн м.к./мл. Иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) вносили в рабочем разведении. Реакцию учитывали определением оптической плотности субстратно-индикаторной смеси при длине волны 492 нм (ОП<sub>492</sub>). Результат считали положительным при ОП<sub>492</sub> ≥ 0,3.

Изучение диагностических возможностей МКАТ проводили в ИФА с использованием микробных культур возбудителей сапа и мелиоидоза в диапазоне concentra-

ций от 16 млн м.к./мл до 125 тыс. м.к./мл, а также близкородственных буркхольдерий в концентрации 10 млн м.к./мл и гетерологичных микроорганизмов: *Yersinia pestis* (1 штамм), *Yersinia enterocolitica* (3 штамма), *Yersinia pseudotuberculosis* (3 штамма), *Escherichia coli* (1 штамм), *Francisella tularensis* (4 штамма), *Brucella abortus* (5 штаммов), *Brucella melitensis* (4 штамма), *Brucella suis* (5 штаммов), *Legionella pneumophila* (3 штамма), *Bacillus anthracis* (3 штамма), *Vibrio cholerae* (1 штамм) в концентрации 100 млн м.к./мл. Постановку ИФА осуществляли, как описано выше.

Результаты исследования сывороток крови животных, иммунизированных антигенам *B. mallei* и *B. pseudomallei*, показали высокий уровень их специфической активности в титрах антител в ИФА 1:40000 — 1:320000 и 1:5000 — 1:640000, соответственно. Животных с наибольшим уровнем сероконверсии использовали в качестве источника иммунных спленоцитов.

В ходе проведенных экспериментов по гибридизации миеломных клеток с В-лимфоцитами иммунных мышей и скрининга гибридных культур на специфическую антителопродукцию получили 17 первично-позитивных гибридных клеточных линий, продуцирующих антитела к антигенам *B. mallei* и 20 — к антигенам *B. pseudomallei*. Из дальнейшей работы исключили гибридные клеточные культуры, характеризующиеся наименьшим уровнем продукции специфических антител по результатам трехкратного тестирования в ИФА. Оставшиеся первичные культуры клонировали, размножили путем последовательных пересевов и криоконсервировали. Таким образом, получили 9 гибридом: 258F12H11, 292G4D4, 298C11E11, 301E5F10 — специфичные к *B. mallei* и 253B4D4, 255A6F5, 255B6E1, 283B5H2, 298E9B4 — специфичные к *B. pseudomallei*.

Результаты исследования культуральных и секреторных свойств полученных гибридом показали устойчивость пролиферативной и антителопродуцирующей активности на протяжении 10 пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. При этом их минимальная посевная концентрация составила 12,5 тыс. клеток в 1 мл и 25 тыс. клеток в 1 мл, титр антител в культуральной жидкости находился в интервале от 1:160 до 1:5120, а в асцитической жидкости — от 1:160000 до 1:2560000.

Исследование различных сочетаний МКАТ в качестве сенситина и в составе ИПК показало, что сапные МКАТ гибридных клеточных линий 258F12H11 и 298C11E11 и мелиоидозные МКАТ гибридных клеточных линий 253B4D4, 255A6F5 и 255B6E1 обеспечивают наибольший сигнал иммуноферментной реакции при выявлении микробных культур *B. mallei* и *B. pseudomallei*, соответственно (ОП<sub>492</sub>>2,0).

Вышеуказанные гибридомы были взяты в опыт по оценке диагностических возможностей МКАТ. Результаты опыта показали возможность выявления в ИФА культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* в диапазоне концентраций от 250 тыс. м.к./мл до 2 млн м.к./мл. При этом сочетания «сенситин-конъюгат» — «258F12H11-258F12H11» и «255A6F5-255B6E1» обеспечивают наибольшую чувствительность ИФА. Все исследованные МКАТ не взаимодействовали в ИФА с культурами близкородственных и гетерологичных микроорганизмов, что свидетельствует об их специфичности.

В ходе исследований по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза, было проведено четыре эксперимента по гибридизации клеток мышинной миеломы с В-лимфоцитами мышей линии BALB/c, иммунизированных инактивированными культурами *B. mallei* и *B. pseudomallei*. В результате проведенных гибридизаций и последующих клонирований получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Полученные гибридомы являются активными и стабильными антителопродуцентами специфических моноклональных антител. Показана принципиальная возможность создания иммуноферментных средств выявления возбудителей сапа и мелиоидоза с использованием моноклональных антител, продуцируемых полученными гибридомами, с пределом обнаружения 250 тыс. м.к./мл и более.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж. и др. Антитела. Методы. Книга 1. М., 1991.
2. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18: 383-416.
3. Fazekas De St., Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.* 1980, 35: 1-21.
4. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005 Apr 1; 44 (1): 91-97.
5. Inglis T.J.J. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2005 May, 43 (5): 2201-2206.
6. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975, 256(5517): 495-497.
7. Nakane P.K., Kawaoui A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974, 22(12): 1084-10891.

Поступила 24.01.19

Контактная информация: Куклина Г.В.,  
610117, Киров, Октябрьский пр-т, 119, р.т. (8332)64-18-13

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*В.Ф.Лавров<sup>1,2</sup>, О.А.Свитич<sup>1</sup>, А.С.Казанова<sup>1</sup>, А.Р.Кинкулькина<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>*

### **VARICELLA ZOSTER-ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: ИММУНИТЕТ, ДИАГНОСТИКА И МОДЕЛИРОВАНИЕ IN VIVO**

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, <sup>2</sup>Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва

Varicella Zoster Virus (VZV) — высоко контагиозный вирусный агент семейства Herpesviridae, обладающий строгой видовой специфичностью и вызывающий два различных заболевания — ветряную оспу, преимущественно у детей, и опоясывающий герпес — чаще у пожилых людей. Получение дополнительных сведений о жизненном цикле вируса, его биологии, патогенетических особенностях вызываемых им осложнений будет способствовать появлению более совершенных методов диагностики и профилактики, разработке новых экспериментальных подходов, позволяющих изучать врожденные и адаптивные механизмы иммунной защиты при VZV-инфекции.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 82—89

Ключевые слова: VZV-инфекция, ветряная оспа, опоясывающий герпес, врожденный иммунитет, диагностика, моделирование инфекции in vivo

*V.F.Lavrov<sup>1,2</sup>, O.A.Svitich<sup>1</sup>, A.S.Kazanova<sup>1</sup>, A.R.Kinkulkina<sup>1</sup>, V.V.Zverev<sup>1</sup>*

### **VARICELLA ZOSTER VIRUS INFECTION: IMMUNITY, DIAGNOSIS AND MODELLING IN VIVO**

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, <sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russia

Varicella Zoster Virus (VZV) is a highly contagious viral agent of the Herpesviridae family, which has a strict species specificity, and causes two different diseases — chickenpox, mainly in children, and herpes