

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 616.9:579.61

Г.Н. ФЕДЮКИНА*, С.С. ВЕТЧИНИН*, Е.В. БАРАНОВА, С.Ю. РУДНИЦКИЙ, П.В. СОЛОВЬЕВ,
Н.В. КОЛОСОВА, С.Ф. БИКЕТОВ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
п. Оболенск, Московская область, 142279

e-mail: galafed@mail.ru,
vetchinin@obolensk.com

Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза

Получены гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к липополисахариду *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. Подобраны оптимальные условия для конъюгации антител с наночастицами коллоидного золота размером 20 нм. Иммуно-дот-анализ показал наличие реакции полученных конъюгатов с липополисахаридами клеток возбудителей сапа и мелиоидоза и отсутствие перекрестной реакции с клетками трех штаммов грамположительных и пяти штаммов грамотрицательных бактерий. Показана возможность использования полученных золотоконъюгатов в иммунохроматографических тестах для выявления и идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза.

Ключевые слова: иммунохроматография, коллоидное золото, конъюгат, мелиоидоз, моноклональные антитела, сап.

Сап и мелиоидоз — особо опасные инфекционные заболевания, вызываемые патогенными буркхольдериями *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Природные очаги зарегистрированы в Юго-Восточной Азии и на севере Австралии [1—3]. Заражение людей в очагах происходит чаще всего аэрогенным или контактным путем от инфицированных животных. Распространение сапа и мелиоидоза на других территориях возможно за счет завоза больных животных, в частности, лошадей и аква-

риумных рыб, а также контаминированных пищевых продуктов, почвы и воды. Поскольку возбудитель сапа постоянно циркулирует в ряде сопредельных стран (Монголия, Турция, Иран и др.), вероятность распространения этой инфекции на территорию России существует [4, 5]. Отсутствие вакцин против сапа и мелиоидоза и высокая контагиозность возбудителей позволяет отнести их к потенциальным агентам биотерроризма (ПАБ) [6—8]. Угроза применения возбудителей сапа и

Федюкина Галина Николаевна, Ветчинин Сергей Сергеевич, Баранова Евгения Владимировна, Рудницкий Станислав Юлианович, Соловьев Павел Владимирович, Колосова Наталья Вячеславовна, Бикетов Сергей Федорович.

Список сокращений: БСА — бычий сывороточный альбумин; ДМСО — диметилсульфоксид; ИФА — иммуноферментный анализ; ИХ — иммунохроматография; КЗ — коллоидное золото; ЛПС — липополисахарид; моноАТ — моноклональные антитела; МФА — метод флуоресцирующих антител; НЦМ — нитроцеллюлозная мембрана; ОП — оптическая плотность; ПАБ — потенциальные агенты биотерроризма; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЭГ — полиэтиленгликоль; РНГА — реакция непрямой гемагглютинации; ТИФА — твердофазный ИФА; ФБР — фосфатно-солевой буферный раствор; ФБР-Т — ФБР, содержащий 0,05% твина-20.

* Авторы для переписки.

мелиоидоза в качестве ПАБ требует разработки ускоренных методов их идентификации.

Лабораторная диагностика сапа и мелиоидоза в нашей стране регламентирована нормативными документами Роспотребнадзора [9, 10] и включает комплекс методов исследования зараженного материала.

Для мониторинга возбудителей сапа и мелиоидоза создан референс-центр на базе ФКУЗ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, занимающийся изучением биологических, молекулярно-генетических и биохимических свойств *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также разработкой современных подходов к диагностике сапа и мелиоидоза [5]. Созданные в Волгоградском НИПЧИ иммуноферментные тест-системы позволяют обнаружить антигены возбудителей сапа и мелиоидоза в бактериальных взвесах, образцах сред культивирования псевдомонад, экстрацеллюлярных антигенных смесях, пробах тканевых жидкостей и суспензиях органов тест-животных [11].

Существуют различные методы обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза: бактериологические, биохимические, молекулярно-генетические и серологические [12]. Для экспресс-диагностики сапа и мелиоидоза используют метод флуоресцирующих антител (МФА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), реакцию двойной иммунодиффузии, иммуноблоттинг [5]. Перспективным является применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сочетании с ТИФА на основе моноклональных антител (моноАТ) [5]. Метод ПЦР широко применяется для детекции и межвидовой дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* [13—15]. Для быстрой диагностики патогенных буркхольдерий также используют газовую, газожидкостную хроматографию и масс-спектрометрический метод [16]. Однако отсутствие масс-спектрометрической базы данных эндемичных для конкретного региона буркхольдерий приводит к ошибочной идентификации [12]. Перечисленные выше методы специфичны и высокочувствительны, однако требуют или большого времени для анализа, или наличия дорогостоящего оборудования. Кроме того, при использовании молекулярно-генетических методов возможны ошибки из-за возникновения случайных мутаций у микроорганизмов [5, 17].

В настоящее время для иммунодетекции вирусов и бактерий все шире используют иммунохроматографический метод [18—22], который не требует дорогостоящего оборудования и высоко-

квалифицированного персонала и обеспечивает короткое время анализа.

Впервые о создании коммерческой иммунохроматографической тест-системы для серодиагностики мелиоидоза (выявления антител к возбудителю) сообщила компания PanBio (Windsor, Queensland, Австралия) [23, 24]. Однако в литературе (как в России, так и за рубежом) отсутствуют данные о коммерческих тест-системах для обнаружения самих возбудителей сапа и мелиоидоза.

В связи с тем, что для обнаружения возбудителей особо опасных инфекций требуется целый комплекс диагностических методов, разработка диагностических препаратов на основе использования иммунохроматографии с их указанными выше преимуществами позволит дополнить спектр используемых в настоящее время в России тест-систем.

Целью настоящей работы было получение моноАТ к ЛПС *B. pseudomallei* и *B. mallei* и создание на их основе биоконъюгатов с коллоидным золотом, пригодных для использования в ИХ-тест-системе.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Реактивы и материалы. ЛПС, полученные методом фенольной экстракции [25] из клеток возбудителей сапа *Burkholderia mallei* шт. С-5 (ЛПС С-5) и мелиоидоза *Burkholderia pseudomallei* шт. С-141 (ЛПС С-141), были любезно предоставлены Государственной коллекцией патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) ГНЦ ПМБ. В работе использовали золотохлористоводородную кислоту, цитрат натрия дигидрат, карбонат калия, карбонат натрия, твин-20, (гидроксиметил)-аминометан (трис), полный и неполный адьюванты Фрейнда, антикродличы иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена, пристан, диметилсульфоксид (ДМСО), азид натрия, питательную среду RPMI 1640, эмбриональную сыворотку теленка, аминокперин, L-глутамин, гипоксантин, тимидин, индикаторные бумажные полоски с интервалом pH 4,5—10,0 (Sigma, США), полиэтиленгликоль 4000 (ПЭГ) (Merck, Германия), БСА (ICN, Biomedicals, Великобритания), бикарбонат натрия (Amresco, США), сахарозу (ROTH, Германия), обезжиренное сухое молоко (Bio Rad, США), гидроокись натрия, лимонную кислоту, сульфат аммония (Helicon, Россия), белок-G-сефарозу (ООО "ИМТЭК", Россия), соляную кислоту ("ХимМед", Россия), нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher&Schuell, Германия), сефадекс G-25, хроматографические

колонки CL-4В и PD-10 (Pharmacia LKB, Швеция), стерильные 12-луночные планшеты (Costar, США) и планшеты для ИФА Nunc maxisorb (Nunc, Дания).

Все соли были аналитической или химической чистоты. Растворы готовили на деионизованной воде, очищенной на установке MilliQ (Millipore, США).

Иммунизация мышей. Мышей линии *BALB/c* (питомник лабораторных животных «Андреевка», самки 6—8-недельного возраста массой 16—18 г) иммунизировали подкожно 100 мкг ЛПС С-5 и ЛПС С-141 (две группы мышей) с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1:1, а через 28 дней подкожно вводили по 100 мкг ЛПС с неполным адьювантом. Через 28 дней следовали три внутривенные инъекции по 20 мкг ЛПС (с десятидневными промежутками). Для гибридизации использовали спленоциты мышей с титром сыворотки в ИФА не менее 1:10 000.

Гибридизация. Для получения гибридом проводили два независимых слияния миеломных клеток линии *SP2/0 Ag14* со спленоцитами мышей, иммунизированных ЛПС С-5, и линии *P3-X63 Ag8.653* со спленоцитами мышей, иммунизированных ЛПС С-141. Слияние проводили в присутствии 50 % ПЭГ (масса/об) и 5 % ДМСО (об/об), pH 8,0 [26]. Селекцию гибридных клеток осуществляли на среде RPMI 1640, содержащей 20 % (об/об) эмбриональной сыворотки теленка, 1 мМ L-глутамин, 1 мМ гипоксантин, 0,1 мМ тимидин и 0,3 мкМ аминокперин. Для скрининга гибридных клеток, продуцирующих моноАТ, использовали твердофазный ИФА [27]. Гибридомы моноАТ клонировали методом предельных разведений.

Получение моноАТ. Для получения препаративных количеств моноАТ мышам линии *BALB/c* (самки 22—24-недельного возраста массой 20—22 г) вводили внутрибрюшинно по 0,5 мл пристана и через две недели — 10^7 гибридных клеток. Сформировавшуюся у мышей асцитную жидкость отбирали, центрифугировали при 10 000 об/мин (ротор F 34-6-38, центрифуга 5810R, Eppendorf) в течение 30 мин, разводили 0,1 М фосфатно-солевым буфером (ФБР), pH 8,6, в соотношении 1:4 и наносили на колонку белок G-сефарозы при скорости 0,5 мл/мин. Промывали колонку буфером для нанесения со скоростью 1,4 мл/мин и затем элюировали моноАТ 0,1 М цитратным буфером, pH 3,0. Раствор антител нейтрализовали 10 М NaOH, осаждали сульфатом аммония (50 % насыщения) при 4° в течение ночи и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 30 мин. Осадок растворяли в ФБР и переводили в необходимый бу-

фер с помощью хроматографии на колонке сефардекса G-25. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически (спектрофотометр SmartSpec Plus, BioRad) при длине волны 280 нм по формуле:

$$C(\text{мг/мл}) = N \cdot 0,77 \cdot \text{ОП}_{280},$$

где N — разведение образца моноАТ, ОП_{280} — оптическая плотность при 280 нм.

Антитела анализировали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле по методу Laemmli в редуцирующих условиях [28]. Специфическую активность моноАТ определяли по стандартным методикам с помощью твердофазного ИФА [27]. В работе использовали антитела с титром в ИФА с ЛПС возбудителей сапа и мелиоидоза не менее 1:10000. Определение индекса аддитивности моноАТ проводили по [29].

Синтез коллоидного золота (КЗ). Коллоидное золото получали восстановлением 0,01%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты 1%-ным раствором цитрата натрия [30]. Чтобы получить частицы коллоидного золота размером около 20 нм, к 50 мл раствора золотохлористоводородной кислоты добавляли 1,5 мл раствора цитрата натрия при кипении и мягком перемешивании. Через 20 мин получали золь красного цвета с ОП $0,97 \pm 0,03$ ($\lambda = 519$ нм) и pH 5,5.

Определение оптимального значения pH конъюгации. Получали золото-содержащие золи с разным значением pH (7,0, 7,5, 8,0 и 8,5), используя свежеприготовленный 0,2 М раствор K_2CO_3 . Измерение pH проводили с помощью полосок индикаторной бумаги. Необходимое количество раствора моноАТ смешивали с КЗ, через 20 мин регистрировали спектры поглощения смесей на спектрометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США).

Определение “золотого числа”. Оптимальную концентрацию моноАТ определяли по методике, описанной в [31]. Для этого готовили разведения моноАТ в воде (по 0,2 мл) от 0 до 150 мкг/мл, добавляли по 2 мл КЗ и перемешивали при комнатной температуре. Через 10 мин в каждую смесь вносили по 0,2 мл свежеприготовленного 10%-ного раствора NaCl и продолжали перемешивание еще 10 мин. Измеряли ОП растворов при длине волны 580 нм и строили график концентрационной зависимости.

Получение конъюгатов моноАТ с КЗ. Конъюгацию антител с частицами КЗ проводили по методике [31]. Непосредственно перед использованием антитела диализовали против 0,005 М карбонатного буфера, pH 8,2. Величину pH коллоидного раствора доводили до необходимого значе-

ния с помощью свежеприготовленного 0,2 М раствора K_2CO_3 . 10 мл КЗ добавляли к 0,008 мл моноАТ 3D3 с концентрацией 7,4 мг/мл или к 0,029 мл моноАТ 2D11 с концентрацией 3,4 мг/мл. Смесь мягко перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляли 0,5 мл 10 %-ного раствора БСА и продолжали инкубировать еще 30 мин. После центрифугирования при 18100 g в течение 30 мин и двукратного промывания в 0,01 М ФБР, pH 7,4, содержащем 0,3% БСА, осадок ресуспендировали в 1,5 мл буфера, содержащего 0,02 М трис, pH 8,2, 1 % сахарозы, 1 % БСА, 0,02 % твина-20 и 0,01 % азида натрия. Значения ОП полученных конъюгатов составляли 4,6 для моноАТ 3D3 и 5,3 для моноАТ 2D11 ($\lambda = 520$ нм).

Прямой иммунодот-анализ. Функциональную активность и специфичность конъюгатов моноАТ-КЗ определяли методом прямого иммунодот-анализа. В центр НЦМ наносили по 2 мкл антигена ЛПС С-5 или С-141 в концентрации 0,3 мг/мл, а по периметру — суспензию клеток *Yersinia enterocolitica* (№ 665, ГКПМ, Оболенск), *Yersinia pseudotuberculosis* (№ 1061, ГКПМ, Оболенск), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 9027), *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Salmonella typhimurium* (АТСС 13311), *Staphylococcus epidermis* (АТСС 14990), *Bacillus subtilis* (АТСС 6633), или *Bacillus cereus* (АТСС 9634) (из коллекции культур ФБУН ГНЦ ПМБ) в концентрации 10^9 кл/мл. Мембраны сушили на воздухе, инкубировали в 5 %-ном растворе молока в течение 1 ч при температуре 37°, трижды промывали в ФБР с 0,05 % твина-20 (ФБР-Т) и инкубировали 20 мин в растворе биоконъюгата с ОП 2,0. После отмывки фильтров в ФБР-Т полученный результат регистрировали визуально.

Сэндвич дот-анализ. По 4 мкл моноАТ 3D3 или 2D11 с концентрацией 2 мг/мл наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану инкубировали в 5 %-ном молоке, отмывали дважды в ФБР-Т, погружали в растворы ЛПС С-5 или С-141 с концентрацией 10 мкг/мл на 40 мин при 37°, отмывали 4 раза ФБР-Т и инкубировали с каждым конъюгатом в течение 20 мин с последующей отмывкой ФБР-Т и водой.

Иммунохроматографический тест. На полоски НЦМ шириной 5 мм наносили по 10 мкл моноАТ 3D3 и 2D11 с концентрацией 2 мг/мл в качестве тестовой зоны. Образцы стекловолоконного фильтра РТН-5 производства МДИ (Индия) размером 5 × 5 мм пропитывали растворами конъюгатов с ОП 2 (по 10 мкл на 1 конъюгатную «подушечку») и помещали под стрип в начале полоски. На полоску наносили 100 мкл ФБР, содержащего ЛПС С-5 *B. mallei* в концентрации 30 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение моноАТ

В результате селекции, клонирования и реклонирования позитивных гибридов было выделено 6 гибридом, продуцирующих моноАТ к ЛПС микроорганизмов, вызывающих сап и мелиоидоз. Для получения конъюгатов антител с коллоидным золотом были отобраны 2 моноАТ — 2D11 (IgG1) и 3D3 (IgG1) — показавших наибольший индекс аддитивности с ЛПС сапа и мелиоидоза, равный 65 % (другие комбинации пар моноАТ всех полученных гибридом имели индекс аддитивности менее 30%).

Полученные моноАТ специфически взаимодействовали с ЛПС С-5 и С-141 при проведении твердофазного ИФА и иммуноблотинга. МоноАТ не имели перекрестной реакции в ИФА с клетками грамотрицательных бактерий (*Burkholderia thailandensis* 251, *B. cepacia* 17759, *B. cepacia* ВТХ, *B. cepacia* АТСС 17769, *E. coli* АТСС 25922, *Yersinia enterocolitica* 665, *Y. pseudotuberculosis* 1061, *Salmonella typhimurium* АТСС 13311, *Brucella abortus* 19ВА, *Brucella melitensis* 16М, *Francisella tularensis* 15/10) и псевдомонад (*Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, *P. aeruginosa* 170003, *P. fluorescens* 34, *P. putida* 37, *P. stutzeri* АТСС 17591).

Процесс получения конъюгатов моноАТ-КЗ

Метод получения КЗ, использованный в данной работе, относится к наиболее распространенным конденсационным методам, основанным на восстановлении галогенидов золота (в данном случае, золотохлористоводородной кислоты) химическими восстановителями [32]. В качестве восстановителя использовали цитрат натрия, впервые примененный для этих целей в 1951 г. [33] и использованный в пионерской работе [34] для синтеза золотых наночастиц среднего размера (порядка 20 нм).

Для создания функционального иммунозолотого конъюгата были оптимизированы условия конъюгации моноАТ с КЗ. Поскольку белки имеют полиамфолитную природу, они обладают pH-зависимым стабилизирующим действием [35]. Конъюгацию проводили при разных значениях pH (7,0, 7,5, 8,0 и 8,5). Спектры поглощения растворов конъюгатов представлены на рис. 1.

Для получения обоих видов меченых антител в качестве оптимального был выбран pH 7,5 (для исследованных антител $pI = 6,8 — 7,4$).

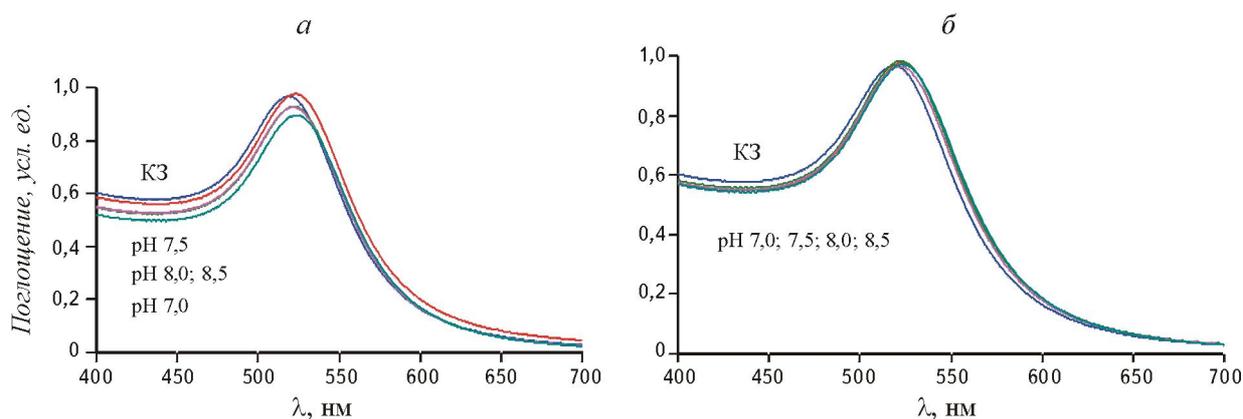


Рис. 1. Спектры поглощения конъюгатов моноАТ 3D3-КЗ (а) и 2D11-КЗ (б) с КЗ при значении рН 7,0—8,5. Верхние кривые отражают спектр гидрозоля золота, а четыре нижние — конъюгатов, полученных при разных рН

Затем были определены минимальные количества моноАТ в составе конъюгатов, достаточные для предотвращения коагуляции золотого золя при добавлении к нему концентрированного раствора NaCl [35] («золотое число»). Избыток белка может вызвать конкурентную адсорбцию свободных молекул белка, оставшихся в растворе, и приводит к отрыву уже конъюгированных молекул [36]. Для определения золотого числа одинаковое количество КЗ конъюгировали с моноАТ в возрастающей концентрации при постоянной температуре и анализировали ОП каждого раствора при длине волны 580 нм [31]. Полученные концентрационные зависимости представлены на рис. 2.

При увеличении ионной силы (после добавления NaCl) красный раствор становился бесцветным, что свидетельствовало об агрегации наночастиц золота. При достаточном количестве белка коллоид оставался стабильным, что видно по сниже-

нию и выходу на постоянное значение поглощения при длине волны 580 нм (см. рис. 2). Концентрация, при которой кривая для биоконъюгата моноАТ 3D3 выходит на плато, соответствует 5,0 мкг/мл, а для моноАТ 2D11 — 9 мкг/мл. С учетом 10%-ного отклонения [31] оптимальные значения концентраций моноАТ составили 5,5 и 9,9 мкг на 1 мл золя, соответственно.

Иммунодот-анализ. На рис. 3 представлены результаты взаимодействия полученных конъюгатов с ЛПС С-5 и ЛПС С-141 и клеток грамположительных (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 9634, *Staphylococcus epidermis* ATCC 14990) и грамотрицательных (*Yersinia enterocolitica* 665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Yersinia pseudotuberculosis* 1061, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311) бактерий.

Образцы ИЦМ I и II инкубировали в конъюгате 3D3-КЗ, образцы III и IV — в конъюгате 2D11-КЗ.

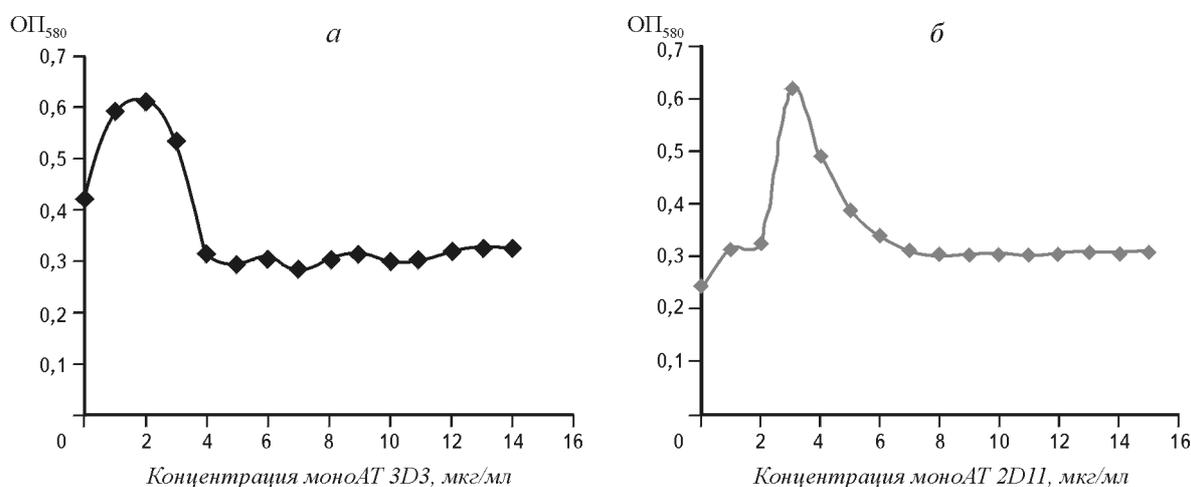


Рис. 2. Изотермы конъюгации моноАТ 3D3 (а) и 2D11 (б) с частицами КЗ

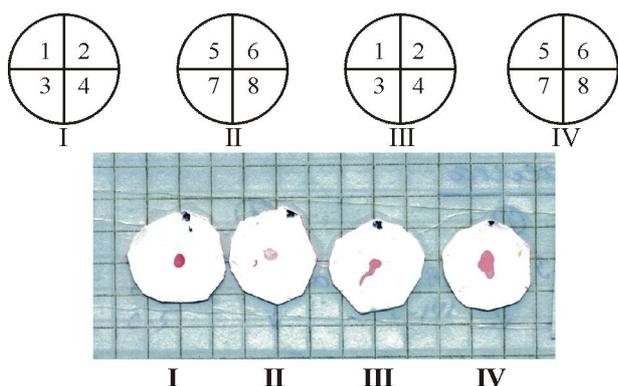


Рис. 3. Прямой дот-анализ для определения специфичности золото-содержащих иммуноконъюгатов 2D11 (I и II) и 3D3 (III и IV). В центре образцов I и III находится ЛПС С-5, а образцов II и IV — ЛПС С-141: 1 — *Bacillus subtilis* ATCC 6633; 2 — *Yersinia enterocolitica* 665; 3 — *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; 4 — *Yersinia pseudotuberculosis* 1061; 5 — *E. coli* ATCC 25922; 6 — *Salmonella typhimurium* ATCC 13311; 7 — *Bacillus cereus* ATCC 9634; 8 — *Staphylococcus epidermis* ATCC 14990

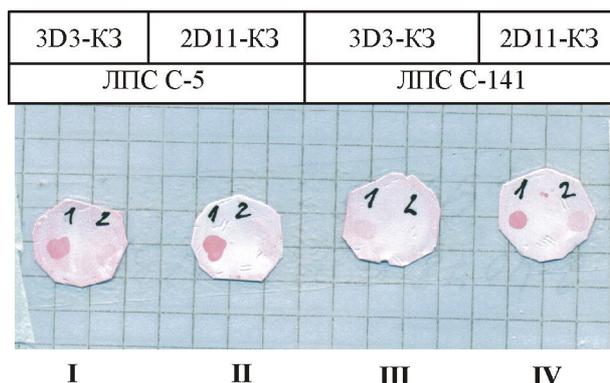


Рис. 4. Сэндвич-дот-анализ ЛПС возбудителей сапа и мелиоидоза: 1 — моноАТ 3D3, нанесенные на НЦМ; 2 — моноАТ 2D11, нанесенные на НЦМ. Образцы I и II инкубировали в растворе ЛПС возбудителя сапа, 10 мкг/мл, образцы III и IV — в растворе ЛПС возбудителя мелиоидоза, 10 мкг/мл. Далее образцы I и III инкубировали с конъюгатом 3D3-КЗ, образцы II и IV — с конъюгатом 2D11-КЗ

Пятна в центре НЦМ свидетельствуют о реакции взаимодействия золотых конъюгатов с ЛПС сапа и ЛПС мелиоидоза. Связывание конъюгатов с контрольными микроорганизмами отсутствовало.

Результаты дот-анализа свидетельствуют о том, что полученные конъюгаты не дифференцируют ЛПС штамма С-5 возбудителя сапа от ЛПС штамма С-141 возбудителя мелиоидоза.

В связи с тем, что золото-содержащие конъюгаты предполагается использовать для создания ИХ-теста с целью одновременной детекции сапа и мелиоидоза, необходимо было определить оптимальные пары антител в аналитической зоне и в конъюгате. Для этого использовали сэндвич-дот-анализ в сочетании с ИХ-тестом. Результаты сэндвич-дот-анализа представлены на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что наиболее интенсивную окраску в точке взаимодействия наблюдали при нанесении на НЦМ моноАТ 3D3 и использовании для обнаружения ЛПС штаммов С-5 и С-141 конъюгата с моноАТ 2D11 (пятно 1 в образцах НЦМ II и IV).

В связи с тем, что оба золото-содержащих конъюгата более эффективно выявляют ЛПС С-5 в сэндвич-дот-анализе (см. рис. 4), для подбора пары моноАТ-конъюгат для ИХ-теста использовали именно этот ЛПС. Результаты ИХ теста представлены на рис. 5. Все варианты ИХ-тест-полосок выявляли ЛПС С-5, однако наиболее яркая окраска тестовой полосы была характерна для пары моноАТ 3D3 и конъюгата 2D11-КЗ (полоска 3). Все остальные комбинации моноАТ и золотых конъюгатов показали менее интенсивные полосы на ИХ-стрипах.

На основании полученных результатов предпочтительным представляется использование па-

ры моноАТ 3D3 и 2D11-КЗ при дальнейшей разработке ИХ-тест-системы для детекции возбудителей сапа и мелиоидоза.

Таким образом, получены два биоконъюгата частиц коллоидного золота размером 20 нм и моноклональных антител против липополисахарида клеток *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Дот-анализ показал, что золото-содержащие конъюгаты на основе использованных моноАТ выявляли только ЛПС возбудителей сапа и мелиоидоза и не взаимо-

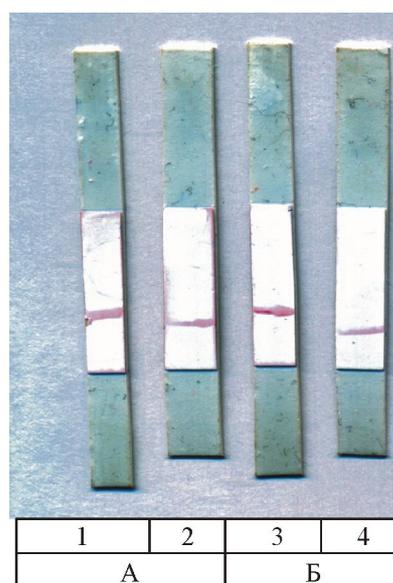


Рис. 5. Результаты взаимодействия моноАТ с ЛПС С-5 с помощью золото-содержащих иммуноконъюгатов 3D3-КЗ (А) и 2D11-КЗ (Б) на ИХ-тест-полосках. В аналитическую зону тест-полосок 1 и 3 нанесены моноАТ 3D3, а тест-полосок 2 и 4 — моноАТ 2D11

действовали с контрольными штаммами грамположительных и грамотрицательных бактерий. Биоконьюгаты не дифференцировали ЛПС возбудителей сапа и мелиоидоза, но позволяли отличать патогенные буркхолдерии от непатогенных. При создании ИХ-тестов можно рекомендовать применение моноАТ 3D3 в аналитической зоне, моноАТ 2D11 в составе золото-содержащего иммуноконьюгата. Полученная на их основе ИХ-тест-система может быть использована в качестве одного из инструментов детекции возбудителей сапа и мелиоидоза. Важно отметить, что ИХ-тест-система является экспресс-системой, с помощью которой можно обнаруживать возбудителей сапа и мелиоидоза в течение 10 мин. Следует отметить, что при разработке ИХ-тест-системы необходимо проводить исследования с максимальным количеством штаммов патогенных буркхолдерий для того, чтобы убедиться, что все исследуемые штаммы возбудителей связываются с используемыми в ИХ-тест-системе моноклональными антителами.

Получено 17.02.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Wiersinga, W.J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* / W. J. Wiersinga, T. van der Poll, N. J. White, N. P. Day, S. J. Peacock // Nat. Rev. Microbiol. — 2006. — V. 4. — P. 272—282.
2. Currie B.J. Intensity of rainfall and severity of melioidosis / B.J. Currie, S.P. Jacups // Australia. Emerg. Infect. Dis. — 2003. — V. 9. — P. 1538—1542.
3. Cheng A.C. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management / A. C. Cheng, B. J. Currie // Clin. Microbiol. Rev. — 2005. — V. 18. — P. 383—416.
4. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева — М.: Медицина, Шико, 2009. — 472 с.
5. Антонов В.А. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* / В. А. Антонов, В. И. Илюхин, Н. П. Храпова, Е. В. Прохвятилова, Д. В. Викторов, Т. В. Сенина, А. А. Будченко, Г. А. Ткаченко, В. В. Алексеева, И. Б. Захарова, С. С. Савченко, О. В. Зинченко, Ю. И. Сорокина, В. В. Алексеев // Пробл. особо опасных инф. — 2012. — В. 112. — № 2. — С. 46—50.
6. Estes, D. M. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders / D. M. Estes, S. W. Dow, H. P. Schweizer, A. G. Torres // Expert Rev. Anti Infect. Ther. — 2010. — V. 8. — N 3. — P. 325—338.
7. Currie, B. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: Melioidosis and glanders Principles and Practice of Infectious Diseases. V. 1. — Philadelphia: Elsevier. Churchill Livingstone, 2004. — P. 2869 — 2979.
8. Allan, D. Dance, B. Melioidosis and Glanders as Possible Biological Weapons: Bioterrorism and Infectious Agents Chapter 4. [Eds Fong and Alibek]. — New York: Springer, 2005. — P. 99—145.
9. МУ 4.2.2831-11. Лабораторная диагностика сапа. Методические указания. — М., 2011. — 24 с.
10. МУ 4.2.2787-10. Лабораторная диагностика мелиоидоза. Методические указания. — М., 2011. — 33 с.
11. Организация и проведение противоэпидемических мероприятий при террористических актах с применением биологических агентов. Рекомендации главного государственного санитарного врача РФ от 6 ноября 2001 года № 2510/11646-01-34. Методические указания. — М., 2001.
12. Foong, Y.C. Melioidosis: a review / Y. C. Foong, M. Tan, R. S. Bradbury // Rural and Remote Health. — 2014. — V. 14. — P. 2763. Available: <http://www.rrh.org.au>
13. Lowe, W. J. PCR-based methodologies used to detect and differentiate the *Burkholderia pseudomallei* complex: *B. pseudomallei* and *B. mallei* and *B. thailandensis* / W. Lowe, J.K. March, A. J. Bunnell, K. L. O’Noill, R. A. Robinson // Curr. Issues Mol. Biol. — 2013. — V. 22. — N 16 (2). — P. 23—54.
14. Ulrich, M.P. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei* / M. P. Ulrich, D. A. Norwood, D. R. Christensen, R. L. Ulrich // J. Med. Microbiol. — 2006. — V. 55(5). — P. 551—559.
15. Janse, I. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* / I. Janse, R. A. Hamidjaja, A. C. Hendrics, B. J. Rotterdam // BMC Infect. Dis. — 2013. — V. 14 (13). — P. 86.
16. Li, D. Gas chromatography - mass spectrometry method for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* from each other, *Burkholderia thailandensis* and several members of the *Burkholderia cepacia* complex / D. Li, J. K. March, T. M. Bills, B. C. Holt, C. E. Wilson, W. Lowe, H. D. Tolley, M. L. Lee, R. A. Robinson // J. Appl. Microbiol. — 2013. — V. 115 (5). — P. 1159—1171.
17. Зинченко О.В. Сравнительная оценка способов выделения ДНК для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью ПЦР / О.В. Зинченко, В.А. Антонов, Г.А. Ткаченко, В.В. Алтухова, В.С. Замараев, Н.Н. Пивень, Ю.А. Голосеев, В.П. Васильев, Л.В. Ломова, В.В. Алексеев // Ж. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2008. — № 1. — С. 55—60.
18. Zhag, P. Development of an immunochromatographic kit for rapid detection of human influenza B virus infection / P. Zhang, Y. Duan, D. Zhang, S. Zhang, Z. Li, X. Wang, P. Yang // Clin. Lab. — 2014. — V. 60(5). — P. 815—819.
19. Chen, W. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa / W. Chen, J. Zhang, G. Lu, Z. Yuan, Q. Wu, J. Li, G. Xu, A. He, J. Zheng, J. Zhang // Clin. Biochem. — 2014. — V. 47(6). — P. 448—454.
20. Ueda, S. Evaluation of immunochromatography for the rapid and specific identification of *Listeria monocytogenes* from

- food / S. Ueda, M. Iwase, Y. Kuwabara // *Biocontrol. Sci.* — 2013. — V. 18(3). — P. 157—161.
21. Бызова Н. А. Разработка иммунохроматографической системы для экспресс-детекции *Mycobacterium tuberculosis* / Н. А. Бызова, А. В. Жердев, С. Ф. Бикетов, Б. Б. Дзантиев // *Биотехнология.* — 2010. — № 3. — С. 70—77.
 22. Spletstoeser, W. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis* — specific antibodies in sera from different mammalian species / W. Spletstoeser, V. Guglielmo, E. Seibold, P. Thullier // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — V. 48(5). — P. 1629—1634.
 23. Cuzzubbo, A. J. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M and immunoglobulin G immunochromatographic test for diagnosis of melioidosis infection / A. J. Cuzzubbo V. Chenthamarakshan, J. Vadivelu, S. D. Putuchery, D. Rowland, P. L. Devine // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — V. 38. — P. 1670—1671.
 24. O'Brien, M. Further Evaluation of a Rapid Diagnostic Test for Melioidosis in an Area of Endemicity / M. O'Brien, K. Freeman, G. Lum, A. C. Cheng, S. P. Jacups, B. J. Currie // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — V. 42. — N 5. — P. 2239—2240.
 25. Westphal, O., Jann, K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure: Methods in carbohydrate chemistry. V. 5. [Ed. Roy L. Whistler]. — New York: Academic Press Inc., 1965. — P. 83—91.
 26. Nowinski, R. C. The isolation of hybrid lines producing monoclonal antibodies against the p15 (E) protein of ceotropic murine Leukemia viruses / R. C. Nowinski, M. E. Lostrom, M. R. Tam, M. R. Stone, W. N. Burnette // *Virology.* — 1979. — V. 93. — P. 111—126.
 27. Михайлов А. Т., Смирский В. Н. Методы иммунологического анализа в биологии развития. — М.: Наука, 1991. — 288 с.
 28. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227. — P. 680—685.
 29. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. — М.: Высшая школа, 1991. — С. 174—175.
 30. Handly, D. A. Methods for synthesis of colloidal gold: / in *Colloidal gold.* V. 1. [Ed. M. A. Hayat]. — London: Academic Press, 1989. — P. 14—32.
 31. Hermanson, G. T. Preparation of colloidal-gold-labeled proteins: Bioconjugate techniques — 2nd ed. — London: Elsevier Inc., 2008. — P. 924—935.
 32. Дыкман Л. А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев // *Успехи химии.* — 2007. — Т. 76. — № 2. — С. 199—213.
 33. Turkevich, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold / J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier // *Discuss. Faraday Soc.* — 1951. — V. 11. — P. 55—75.
 34. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* — 1973. — V. 241. — N 1. — P. 20—22.
 35. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Шеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение. — Москва: Наука, 2008. — 320 с.
 36. Bendayan, M. Protein A—gold and protein G—gold postembedding immunoelectron microscopy: *Colloidal gold.* V. 1. [Ed. M. A. Hayat]. — London: Academic Press, 1989. — P. 33—41.
- G.N. FEDIUKINA*, S.S. VETCHININ*, E.V. BARANOVA, S.Yu. RUDNITSKII, P.V. SOLOVIOV, N.V. KOLOSOVA, and S.F. BIKETOV
- The State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moskovskaya oblast Russia
- e-mail: galafed@mail.ru
vetchinin@obolensk.com

Obtaining of Components of Immunochromatography Test for Glanders and Melioidosis Causes Detection

Hybridomas producing monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* have been obtained. Optimal conditions for the antibody conjugation with colloidal gold particles (20 nm) were selected. The dot-immunoanalysis showed that the obtained conjugates interact with the glanders and melioidosis causes and fail to cross-react with 3 Gram-positive and 5 Gram-negative bacteria strains. The obtained gold-conjugates were shown to be helpful in immunochromatography tests for the detection of the glanders and melioidosis causes.

Key words: colloidal gold, conjugate, glanders, immunochromatography, melioidosis, monoclonal antibodies.

* Authors for correspondence.