

УДК 57.083.3

Новые моноклональные антитела для иммунофлуоресцентной диагностики респираторно-синцитиальной инфекции

© 2017 И.В. АМОСОВА, В.З. КРИВИЦКАЯ, Т.А. ТИМОШИЧЕВА*, Е.В. СОРОКИН, Е.Р. ПЕТРОВА

ФГБУ «НИИ гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197376

e-mail: tatianatim@mail.ru*

Поступила 01.06.2017 г.

Принята в печать 29.06.2017 г.

Настоящая работа посвящена изучению диагностических свойств новых моноклональных антител к F-белку РСВ при иммунофлуоресцентном анализе с целью дальнейшего использования их в разработке диагностических систем для выявления РСВ. Специфическая активность моноАТ в отношении РСВ-А (штаммы Long и A2) и РСВ-В (штамм 9320) была исследована методом непрямой ИФЛ. По результатам исследования отобраны моноАТ, обладающие высокой специфичностью к обеим генетическим группам РСВ. Использование этих моноАТ при разработке диагностических тест-систем позволит значительно усовершенствовать лабораторный надзор за циркуляцией РСВ на территории России.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус, диагностика, моноклональные антитела, иммунофлуоресцентный анализ.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-77-82

Респираторно-синцитиальный вирус – часто встречающийся возбудитель инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей как у детей, так и у взрослых. Инфекции, вызванные этим вирусом, иногда приводят к возникновению серьезных заболеваний нижних дыхательных путей и являются основной причиной госпитализации детей младшего возраста в развитых странах мира.

Возбудители РСВИ – РНК-содержащие вирусы, относящиеся к семейству Paramyxoviridae, роду *Pneumovirus*. Вирионы отличаются большой полиморфностью; геном представлен однонитчатой «–РНК». В состав вирусной оболочки входят два поверхностных гликопротеина: прикрепительный G (связывается с рецепторами клетки) и слияния F (обеспечивает слияние и образование синцития). На основании вариабельности протеина G выделяют две генетические группы РСВ (А и В).

Роль респираторно-синцитиальной вирусной инфекции в структуре респираторных заболеваний существенно недооценена. Симптомы РСВИ и гриппа сходны клинически, особенно у взрослых людей, и зачастую случаи РСВИ в период эпидемии гриппа остаются нераспознанными. РСВ в значительно большей степени, чем вирус гриппа, способствует развитию иммунопатологических проявлений, включая гиперреактивность дыхательных путей и обструктивные процессы в легких [1]. Эта особенность РСВ является фактором риска тяжелого течения инфекции, особенно у детей первых лет жизни и лиц пожилого возраста. Своевременность назначения адекватной терапии и изоляции больного, а также исключение антибиотикотерапии на ранних сроках заболевания напрямую зависят от ранней диагностики РСВИ, от ее распознавания среди других вирусных

Список сокращений: Ав – аденовирус; БОЕ – бляшкообразующая единица; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ИФЛ – иммунофлуоресценция; моноАТ – моноклональные антитела; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РСВ – респираторно-синцитиальный вирус; РСВИ – респираторно-синцитиальная вирусная инфекция; ТЦД₅₀ – доза возбудителя, вызывающая цитопатические изменения у 50% клеток инфицированной культуры; ЦПД – цитопатическое действие вируса; ФИТЦ – флуоресцинизиотиацианат.

заболеваний со сходными симптомами (грипп, аденовирусная, короновиральная, риновирусная инфекции и др.). Для решения сложнейшей задачи ранней идентификации возбудителя требуется применение строго специфичных и высокочувствительных методов лабораторной диагностики.

По мнению авторов [2], диагностируется около 20–25% случаев РСВИ, что может быть связано с низкой чувствительностью коммерческих тест-систем. В настоящее время для детекции РСВ в клинических материалах наиболее часто используют метод выделения вируса в культуре клеток, выявление вирусных антигенов методом ИФЛ, а также ПЦР в различных модификациях. В системе надзора за РСВ в России широко используют метод ИФЛ с применением специфичных поликлональных сывороток, характер и спектр реагирования которых зависит от особенностей иммунного ответа животного-производителя и состава вырабатываемых антител. В отличие от поликлональных современные тест-системы основаны на использовании моноклональных антител (моноАТ) к определенным антигенным детерминантам вируса, направленность которых в конечном счете определяет не только чувствительность, но и спектр реагирования тест-системы [3]. МоноАТ стабильно сохраняют специфичность и аффинность и могут быть получены в практически неограниченных количествах.

Цель настоящей работы – изучить в ИФЛ диагностические возможности новых моноклональных антител к F-белку РСВ, разработанных в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа», для использования их в тест-системах по выявлению РСВ обеих генетических групп.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Моноклональные антитела

МоноАТ 1Н3, 4F2, 5F3, 5F8 и 5Н8 к F-белку РСВ штамма Long были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» в соответствии с [4].

Клеточные культуры и вирусы

Для заражения клеточных культур использовали три эталонных штамма РСВ, принадлежащих к разным антигенным группам: Long (группа А), полученный из National Institute for Medical Research (London), А2 (группа А) и 9320 (группа В), полученные из коллекции Influenza Reagent Resource (IRR) (Department of Human

Retrovirology, Academic Medical Center, Университет Амстердама, Нидерланды). Для контроля специфичности полученных моноАТ в качестве гетерологического вируса был использован аденовирус 6-го типа (Ав) штамм Tonsill-99 (получен из музея вирусов ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа»).

Вирусы культивировали в перевиваемой клеточной культуре MA-104 (эпителиальные клетки почки обезьяны), полученной из коллекции Музея вирусов ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Получение образцов для иммунофлуоресцентного анализа

В качестве исследуемых образцов использовали клеточные культуры MA-104, выращенные на поверхности покровных стекол в пробирках и зараженные РСВ штаммов Long, А2 и 9320 в дозе 10^2 ТЦД₅₀/мл. Контрольными образцами служили незараженные клеточные культуры, а также культуры, зараженные Ав в дозе 10^2 ТЦД₅₀/мл. Инфицированные Ав клетки ежедневно исследовали под световым микроскопом. В случае обнаружения слабого цитопатического действия в культуре (образование симпластов или появление круглых клеток и незначительное разрежение монослоя в клеточных культурах) полоски покровных стекол извлекали из пробирок, высушивали при комнатной температуре и фиксировали в 80%-ном охлажденном ацетоне в течение 10 мин. Клеточные культуры, зараженные РСВ, фиксировали на 5-е сутки инкубации при температуре 37 °С, зараженные Ав (а также незараженные) – через 48 ч.

Непрямой иммунофлуоресцентный метод

Окрашивание образцов и оценку яркости флуоресценции проводили согласно [5]. Полученные моноАТ тестировали непрямой методом с использованием меченных ФИТЦ антимышиных антител (Sigma, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные к F-белку РСВ штамма Long моноАТ 1Н3, 4F2, 5F3, 5F8 и 5Н8 были исследованы методом непрямой ИФЛ для определения спектра их реагирования и оценки диагностических свойств. В качестве образцов для диагностики использовали монослойную культуру клеток MA-104, зараженную эталонными штаммами РСВ (10^2 ТЦД₅₀), которые принадлежат к разным генетическим группам: А (штаммы А2 и Long)

и В (штамм 9320). В качестве контрольных образцов использовали как незараженную, так и зараженную Ав культуру клеток *MA-104*.

При исследовании образцов, инфицированных РСВ генетической группы А (штаммы А2 и Long), отчетливую диффузную флуоресценцию умеренной интенсивности в цитоплазме клеток наблюдали при использовании моноАТ 1Н3 в концентрации 2,5 мкг/мл, 4F2 и 5F3 (5 мкг/мл) и 5F8 (10 мкг/мл). При использовании моноАТ 4F2 и 5F3 в концентрации 2,5 мкг/мл количество светящихся клеток было значительно ниже, чем при 5 мкг/мл. МоноАТ 5F8 в концентрации 5 мкг/мл обуславливало уменьшение интенсивности свечения в ИФЛ по сравнению с 10 мкг/мл.

При исследовании образцов, зараженных РСВ генетической группы В (штамм 9320), диффузное свечение в цитоплазме зараженных клеток наблюдали при использовании моноАТ 1Н3 и 4F2 в концентрации 10 мкг/мл. В присутствии моноАТ 5F8 в концентрации 10 мкг/мл в цитоплазме инфицированных РСВ-В клеток были видны отдельные светящиеся гранулы. МоноАТ 5F3 не взаимодействовали с клетками, инфицированными РСВ антигенной группы В (таблица).

При использовании моноАТ 5Н8 специфическое свечение в образцах, инфицированных РСВ обеих антигенных групп (А и В), отсутствовало; исследуемые моноАТ даже при их содержании 20 мкг/мл не взаимодействовали с контрольными образцами.

Таким образом, новые моноАТ 1Н3, 4F2 и 5F8 в концентрации 10 мкг/мл позволяют эффективно выявлять РСВ обеих генетических групп методом ИФЛ при полном отсутствии неспецифических реакций. МоноАТ 5F3 и 5Н8 оказались малоактивными или вовсе неактивными при выявлении РСВ методом ИФЛ. Наиболее перспективными для дальнейшего использования в целях разработки диагностических систем, способных выявлять в клинических образцах РСВ обеих антигенных групп, являются моноАТ 1Н3 и 4F2 (рисунок).

Как уже говорилось выше, актуальность простых и быстрых тестов лабораторной диагностики РСВИ определяется необходимостью назначения ранней этиотропной противовирусной терапии и профилактики РСВИ. ВОЗ рекомендует использовать ИФЛ для идентификации возбудителей ОРВИ наряду с выделением вирусов из культуры клеток или ПЦР [6].

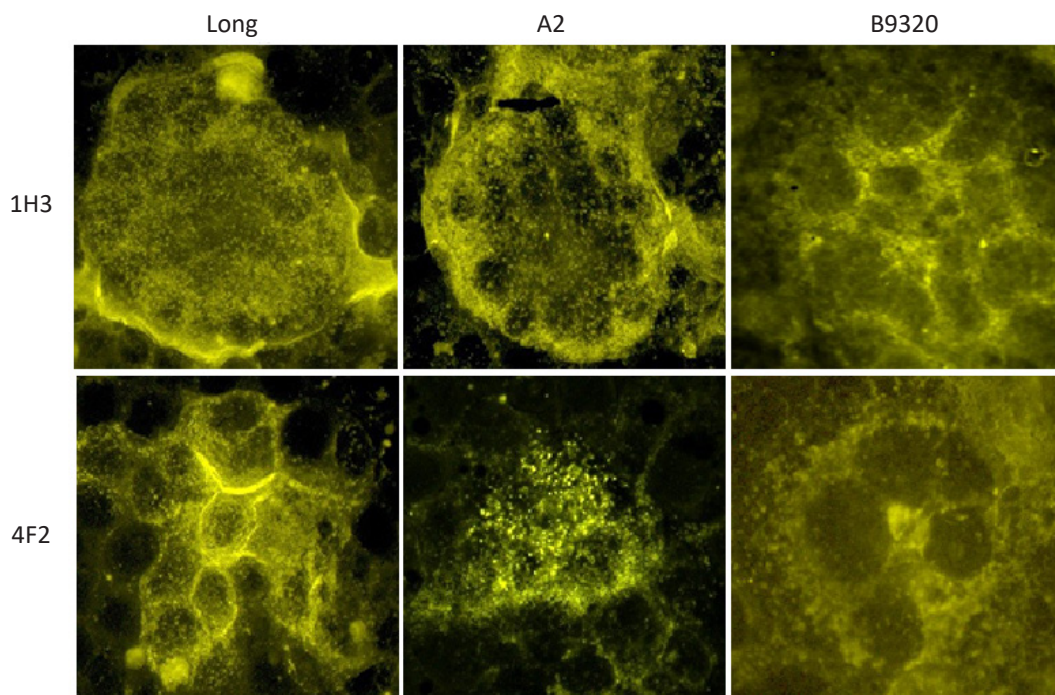
Интенсивность специфического свечения клеток, зараженных РСВ, в реакции непрямой ИФЛ

Intensity of specific fluorescence of RCV-contaminated cells during indirect IFL

Концентрация моноАТ, мкг/мл	Штамм РСВ	Спектр реагирования клеток при использовании моноАТ			
		1Н3	4F2	5F3	5F8
20	Long	++++	+++	++++	+++
	A2	+++	+++	+++	+++
	B9320	+	+	-	+ отдельные гранулы
10	Long	+++	++	+++	++
	A2	+++	++	++	++
	B9320	+	+	-	+ отдельные гранулы
5	Long	+++	++	++	+
	A2	++	+	++	+
	B9320	-	-	-	-
2,5	Long	++	+	+	-
	A2	++	+	+	-
	B9320	-	-	-	-

Примечание: (++++) – исключительно яркая флуоресценция; (+++) – выраженная флуоресценция меньшей интенсивности; (++) – отчетливая флуоресценция умеренной интенсивности; (+) – слабая, неотчетливая флуоресценция; (-) – фоновая аутофлуоресценция клеток.

Footnote: (++++), extremely bright fluorescence; (+++), marked fluorescence of lower intensity; (++) , distinct fluorescence of moderate intensity; (+), weak, indistinct fluorescence; (-), background autofluorescence of cells.



Флуоресценция РСВ-специфичных моноАТ (названия – слева) в клетках *MA-104*, инфицированных различными штаммами РСВ (названия – сверху) при реакции непрямой ИФЛ. Увеличение $\times 1000$

Fluorescence of RSV-specific MAbs (written on the left) in *MA-104* cells inoculated by various RSV strains (written above). Enlargement of $\times 1000$

Выделение вирусов из клеточной культуры – достаточно трудоемкий, дорогостоящий процесс, требующий длительного времени анализа, которое в случае РСВИ может достигать 3 нед. Кроме того, данный метод малочувствителен при исследовании образцов от взрослых людей, особенно лиц пожилого возраста, поскольку количество вирусных частиц в клинических материалах у данного контингента значительно ниже (10^3 БОЕ/мл), чем у детей (10^6 БОЕ/мл) [7]. У лиц пожилого возраста с верифицированной РСВИ только в 65% случаев удается выделить вирус из культуры клеток [8].

ПЦР с обратной транскрипцией является наиболее чувствительным и относительно быстрым (1–2 дня) диагностическим методом. Следует, однако, отметить, что чувствительность при диагностике РСВИ с помощью ПЦР сильно варьирует (по данным различных авторов, в пределах 79–98%) и зависит от возраста обследуемого пациента, хотя специфичность ее и составляет 96–100% [8–10]. Преимуществом ПЦР и ее модификаций является высокая эффективность при диагностике РСВИ у пожилых людей [7], а также возможность детектировать РСВ у пациентов на поздних сроках заболевания (в течение 2 нед.) [11], что актуально при выявлении вирусной персистенции. Тем не менее, ПЦР-диагно-

стика РСВИ значительно менее продуктивна, чем для многих других ОРВИ, например гриппа, вызванного вирусами А и В [12].

В настоящее время активно ведется разработка способов быстрой детекции вирусных антигенов, к которым относятся иммунохроматографические (ИХТ) и иммунофлуоресцентные (ИФЛ) методы. ИХТ-методы позволяют диагностировать ОРВИ непосредственно «у постели больного» с высокой специфичностью (96–100%) в течение 15–30 мин. К недостаткам этого метода можно отнести сравнительно низкую чувствительность существующих коммерческих тестов (57–85% у детей и 29% у взрослых), что в ряде случаев приводит к ложноотрицательным результатам [13, 14].

Несмотря на быстрое совершенствование молекулярных методов диагностики вирусных инфекций, ИФЛ-методы широко используются в клинической практике. Они просты в исполнении и позволяют диагностировать заболевание в течение 1–2 ч. Чувствительность методов ИФЛ при детекции антигенов РСВ в клетках респираторного эпителия из назофарингеальных соскобов или аспиратов с использованием моноАТ варьирует у детей с верифицированной РСВИ от 60% до 98%, а их специфичность при этом достигает 88–100% [15–17].

Полученные в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» моноАТ к F-белку РСВ при исследовании в непрямом ИФЛ отличались высокой специфической активностью и не обладали перекрестной реактивностью с другими возбудителями ОРВИ (Ав) и незараженной культурой клеток. Наиболее перспективными для создания диагностических тест-систем оказались моноАТ 1Н3 и 4F2, использование которых не только выявляло РСВ обеих антигенных групп, но и значительно облегчало интерпретацию результатов ИФЛ за счет более яркой специфической флуоресценции и полного отсутствия фоновых реакций.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Молекулярно-биологическая характеристика современных штаммов респираторно-синцитиального вируса».

ЛИТЕРАТУРА

- Falsey A.R., Cunningham C.K., Barker W.H., et al. Respiratory syncytial virus and influenza A infection in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172(2), 389–394.
- Nair H., Nokes D.J., Gessner B.D., et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.*, 2010, 375(9725), 1545–1555. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60206-1
- Соминина А.А., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. Новые моноклональные антитела для диагностики гриппа и других ОРВИ. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 2015, 14(5), 72–76.
- Кривицкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В., и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. *Биотехнология*, 2016, 32(1), 65–75.
- Соминина А.А. Быстрая диагностика гриппа и других Орви иммунофлуоресцентным методом: методические рекомендации Соминина А.А., Милькинт К.К., Амосова И.В., Майорова В.Г., Царева Т.Р., Сорокин Е.В. Москва. 2006, 10.
- World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44518/1/9789241548090_eng.pdf.
- Englund J.A., Piedra P.A., Jewell A., et al. Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections in immunocompromised adults. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34(7), 1649–1653.
- Falsey A.R., Walsh E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, 13(3), 371–384.
- Akhtar N., Ni J., Stromberg D., Rosenthal G.L., et al. Tracheal aspirate as a substrate for polymerase chain reaction detection of viral genome in childhood pneumonia and myocarditis. *Circulation*, 1999, 99(15), 2011–2018.
- Selvarangan R., Abel D., Hamilton M. Comparison of BD Directigen EZ RSV and Binax NOW RSV tests for rapid detection of respiratory syncytial virus from nasopharyngeal aspirates in a pediatric population. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, 62(2), 157–161. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.005
- Falsey A.R., Formica M.A., Treanor J.J., and Walsh E.E. Comparison of quantitative reverse transcription-PCR to viral culture for assessment of respiratory syncytial virus shedding. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41(9), 4160–4165.
- Lau L.T., Feng X. Y., Lam T. Y., et al. Development of multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of human respiratory tract viruses. *J. Virol. Methods*, 2010, 168(1–2), 251–254. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.04.027
- Chartrand C., Tremblay N., Renaud C., and Papenburg J. Diagnostic accuracy of rapid antigen detection tests for respiratory syncytial virus infection: systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, 53(12), 3738–3749. doi: 10.1128/JCM.01816-15
- Moesker F.M., van Kampen J.J., Aron G., et al. Diagnostic performance of influenza viruses and RSV rapid antigen detection tests in children in tertiary care. *J. Clin. Virol.*, 2016, 79, 12–17. doi: 10.1016/j.jcv.2016.03.022
- Zavattoni M., Percivalle E., Cattaneo E., et al. Optimized detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions. *New Microbiol.*, 2003, 26(2), 133–140
- Quinting B., Robert B., Letellier C., et al. Development of a 1-step enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid diagnosis of bovine respiratory syncytial virus in postmortem specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2007, 19(3), 238–243
- Gökulp C, Gökahmetoğlu S, Deniz ES, Güneş T. Investigation of respiratory syncytial virus by three different methods in children with lower respiratory tract infection. *Mikrobiyol. Bul.*, 2009, 43(3), 433–438

New Monoclonal Antibodies for Immunofluorescence Diagnosis of Respiratory Syncytial Infection

I.V. AMOSOVA, V.Z. KRIVITSKAYA, T.A. TIMOSHICHEVA*, E.V. SOROKIN, and E.R. PETROVA

The Research Institute for Influenza, Ministry of Healthcare of Russian Federation, 197376, St-Petersburg Russia

*e-mail: tatianatim@mail.ru**

Received June 01, 2017

Accepted June 29, 2017

The work has been focused on the study of the diagnostic properties of new monoclonal antibodies to the RSV F-protein in immunofluorescence analysis for the further development of diagnostic tests for the RSV detection on their basis. The specific activity of MAb against RSV-A (strains Long and A2) and RSV-B (strain 9320) was investigated in IF. Based on the results of the investigation, MAbs with high specificity to both genetic groups of RSV were selected. The application of these MAbs to the development of diagnostic test systems will significantly improve the laboratory supervision of the RSV circulation in Russia.

Keywords: respiratory syncytial virus, diagnosis, monoclonal antibodies, immunofluorescence.

Acknowledgements—The work was performed within a framework of the State Assignment on the study of Molecular Biological Characteristics of Current Strains of Respiratory Syncytial Virus.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-77-82