

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 57.083.3; 612.017.1

В.З. КРИВИЦКАЯ*, Е.Р. ПЕТРОВА, Е.В. СОРОКИН, Т.Р. ЦАРЕВА, М.В. СВЕРЛОВА, А.В. ФАДЕЕВ,
А.Б. КОМИССАРОВ, А.А. СОМИНИНА

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа» (НИИ гриппа)
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197376

e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу

Получена панель из 6 новых моноАТ, специфически взаимодействующих в ИФА со штаммами РСВ обеих существующих антигенных групп (А и В). Новые моноАТ направлены к 6 различным конформационно зависимым эпитопам F-белка РСВ, 3 из которых индуцируют синтез вируснейтрализующих антител. С использованием ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени, иммуноблоттинга, определения вируснейтрализующей активности моноАТ и конкурентного и микрокультурального ИФА показано, что вируснейтрализующей активностью обладают моноАТ, синтез которых был индуцирован переменными, а не консервативными детерминантами F-белка РСВ, общими для вирусов из различных антигенных групп. Выявление различий в эффективности реагирования с РСВ моноАТ 4F2 и 5F3 позволяет идентифицировать методом микрокультурального ИФА принадлежность штаммов, выделенных из клинических материалов, к одной из двух антигенных групп (РСВ-А или РСВ-В).

Ключевые слова: антигенное типирование, микрокультуральный ИФА, моноклональные антитела, респираторно-синцитиальный вирус.

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) играет чрезвычайно важную роль в структуре инфекционной патологии дыхательного тракта, особенно у детей первых лет жизни. 70% детей переносят РСВ-инфекцию (РСВИ) в возрасте до 1 года, и практически каждый инфицируется в течение первых трех лет. В развитых индустриальных странах у детей в возрасте до 3 лет, госпитализированных с острыми респираторными заболеваниями-

ми, сопровождающимися поражением нижних отделов дыхательного тракта, частота диагностирования РСВИ достигает 42–63%. При этом РСВ является причиной 50–90% бронхиолитов, 5–40% пневмоний и 10–30% трахеобронхитов. Согласно мета-анализу мировой литературы, в развитых странах среди детей, госпитализированных с РСВИ, смертность составляет в среднем 1% [1–3].

Кривицкая Вера Зорьевна, Петрова Екатерина Романовна, Сорокин Евгений Валентинович, Царева Татьяна Радистовна, Сверлова Мария Викторовна, Фадеев Артем Викторович, Комиссаров Андрей Борисович, Соминина Анна Адольфовна.

Список сокращений: АТ — антитела; БСА — бычий сывороточный альбумин; ВКЖ — вируссодержащая культуральная жидкость; ИФА — иммуноферментный анализ; мк-ИФА — микрокультуральный иммуноферментный анализ; КЖ — культуральная жидкость; ММ — молекулярная масса; моноАТ — моноклональные антитела; НМ — нитроцеллюлозная мембрана; OP_{450} — оптическая плотность при длине волны 450 нм; ОРЗ — острое респираторное заболевание; Пх — пероксидаза хрена; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ПЭГ-1000 — ПЭГ со средней ММ 1000; РСВ — респираторно-синцитиальный вирус; РСВ-А — респираторно-синцитиальный вирус, относящийся к антигенной группе А; РСВ-В — респираторно-синцитиальный вирус, относящийся к антигенной группе В; РСВИ — респираторно-синцитиальная вирусная инфекция; ТИД — тканевая инфекционная доза; $ТИД_{50}$ — ТИД, обуславливающая заражение 50% клеточных культур; ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; $ТЦД_{50}$ — тканевая цитопатическая доза, обуславливающая цитопатические изменения в 50% инфицированных клеточных культур; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; ЦПД — цитопатическое действие; ЭФ — электрофорез; CDC (Center for Disease Control) — Центр по контролю и профилактике заболеваний; IgG — иммуноглобулин класса G; OD_{450} — оптическая плотность при длине волны 450 нм; SDS — додецилсульфат натрия; β -МЕ - β -меркаптоэтанол.

* Автор для переписки.

РСВ является мощным иммуномодулятором, оказывая выраженное иммуносупрессорное действие [4—6]: индуцируемый им иммунный ответ зачастую обеспечивает сравнительно слабое и кратковременное протективное действие, что обуславливает осложненное течение РСВИ и реинфекции, которые наблюдаются у людей на протяжении всей жизни.

Характерной особенностью РСВ является способность вызывать отдаленные патологические последствия. Долгосрочные наблюдения показали, что заболевания нижних дыхательных путей РСВ-этиологии влекут за собой функциональную дыхательную недостаточность, регистрируемую в течение ряда последующих лет, что приводит к развитию хронических респираторных заболеваний. Показано, что обусловленные РСВ острые заболевания нижних дыхательных путей, перенесенные в младенчестве, ассоциированы с повышенным риском возникновения обструкции при последующих ОРЗ и развития со временем бронхиальной астмы. Риск уменьшается с возрастом, но сохраняется в течение не менее 8 лет после перенесенной РСВИ [7, 8]. РСВИ у взрослых с неблагоприятным преморбидным фоном способствует развитию хронических легочных заболеваний — хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы [9, 10].

Поскольку симптомы РСВИ и гриппа сходны клинически (особенно у взрослых людей), в период эпидемии гриппа в большинстве случаев она остается нераспознанной. Недостаточная чувствительность коммерческих тест-систем и отсутствие системы специализированного надзора (особенно в развивающихся странах) приводят к существенной недооценке роли РСВИ в структуре респираторных заболеваний. По мнению некоторых исследователей, диагностируется лишь 20—25% случаев этой инфекции [2]. Быстрое выявление РСВИ чрезвычайно важно при решении вопроса об изоляции больного во избежание нозокомиальных заболеваний, для назначения этиотропной терапии и отказа от применения антибиотиков.

Все вышеизложенное указывает на необходимость изучения патогенеза РСВИ, а также разработки чувствительных методов дифференциальной диагностики данного заболевания. Применение РСВ-специфичных моноклональных антител (моноАТ) может способствовать решению данных задач. МоноАТ успешно используют для детекции антигенов РСВ в клинических материалах с помощью таких простых и доступных методов, как иммунофлюоресцентные, иммуноферментные и иммунохроматографические тесты [11].

Сопоставление результатов, полученных при изучении с помощью моноАТ антигенных характеристик изолятов РСВ, и данных генетического анализа, проведенного по итогам секвенирования, позволяет оценить закономерности изменчивости и эволюции указанного патогена [12, 13].

Цель проделанной работы состояла в создании панели моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу, и характеристика с ее помощью принадлежности изолятов РСВ, выделенных из клинических материалов, к той или иной антигенной группе.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Вирусы. Для характеристики свойств полученных моноАТ были использованы 3 эталонных штамма РСВ, принадлежащие к разным антигенным группам: Long (группа А, 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, University of Amsterdam, Нидерланды).

Культивирование, очистка и концентрирование РСВ. РСВ культивировали в перевиваемой клеточной культуре *МА-104* (эпителиальные клетки почки обезьяны, полученные из коллекции музея вирусов ОРЗ НИИ гриппа) в течение 5—7 сут. В качестве поддерживающей бессывороточной среды использовали alpha-MEM (ООО «БиолоТ», С.-Петербург). Вирусодержащую культуральную жидкость (ВКЖ) подвергали очистке и концентрированию вируса путем ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы по методу Orvell [14]. Содержание белка в очищенном вирусном материале определяли с использованием набора «Pierce® BCA Protein Assay Kit» (Thermo Scientific, США).

Получение моноклональных антител, специфичных к РСВ. Панель моноАТ к РСВ штамма Long была получена в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу [15]. Мышей линии *BALB/c* двукратно с интервалом в 3 нед иммунизировали путем внутрибрюшинного введения очищенного центрифугированием (см. выше) РСВ (по 100 мкг антигена с полным адъювантом Фрейнда (1:1) на мышь). Через 3 дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы линии *X63Ag8.653* в присутствии 50% ПЭГ-1000 (Sigma, США). Культивирование полученных гибридных клеток проводили на селективной среде HAT (Sigma). При первичном тестировании клонов использовали

традиционный метод ИФА: анализируемую КЖ вносили в лунки планшетов, сенсibilизированных очищенным концентратом РСВ (5 мкг/мл), с последующей детекцией прореагировавших моноАТ с использованием пероксидазного конъюгата к IgG мыши (1:5000, Sigma, США). Гибридные клоны с заданным спектром реагирования подвергались многократному реклонированию. Стабильные клоны-продуценты моноАТ использовали для получения асцитных жидкостей. С этой целью мышам линии *BALB/c*, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь), вводили внутрибрюшинно гибридные клетки в количестве 3—5 млн. на мышь. Спустя 2—3 нед асцитную жидкость собирали. Исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 266 Минздрава России от 19.06.2003).

SDS-электрофорез белков РСВ. ЭФ очищенного концентрата РСВ, штамм Long, проводили по методу Лэммли [16] в 4—15%-ном градиенте полиакриламида (Serva, Германия). Вирусные белки разделяли после обработки вируса при различных режимах (в редуцирующих и нередуцирующих условиях). Нередуцирующие условия ЭФ предусматривали преинкубацию проб в течение 2 мин при 100°, либо в течение 1,5 ч при 37° в буфере, содержащем 0,06 М трис-HCl (Sigma), pH 6,8; 2% SDS (Serva), 6% глицерина (ЗАО «ЛенРеактив», Санкт-Петербург) и 0,01% бромфенолового синего (Serva). Для проведения ЭФ в редуцирующих условиях вирусный концентрат кипятили в течение 2 мин в том же буфере с добавлением 5% β-ME (Ferak, Германия). После проведения ЭФ белки в геле окрашивали 0,01%-ным раствором Coomassie R250 (Sigma) в 25%-ном этаноле (ООО «Росбио», Санкт-Петербург) и 10%-ной уксусной кислоте (ЗАО «ЛенРеактив»). Молекулярную массу белков определяли по калибровочной кривой с помощью маркеров (Sigma Color Burst C1992, Sigma).

Иммуноблоттинг. После ЭФ вирусные белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НМ) (0,45 мкм, BioRad, Германия) в буфере для переноса, pH 8,3 (20 мМ трис (Sigma), 192 мМ глицин (Helicon, Москва), 20%-ный этанол) при 100 В в течение 1 ч. Свободные точки на мембране блокировали при 4° в течение 18 ч 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА, Sigma), разведенным 0,01 М ФСБ (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), pH 7,2, с добавлением 0,05% твина-20 (Ferak) (блокирующий раствор ФСБ-БСА). Инкубацию моноАТ (в концентрации 5—10 мкг/мл, разведенных ФСБ-БСА) с вирусными антигенами, перенесенными на НМ, проводили при 37° в течение 2 ч. После отмывания НМ обрабатывали пероксидажным конъюгатом АТ к IgG мыши (Sigma), разведенным 1:1000

блокирующим раствором (см. выше), при 37° в течение 2 ч. Окраску белков на НМ проводили раствором, содержащим ТМБ (Life Technologies, США).

Микрокультуральный ИФА (мк-ИФА) проводили для оценки взаимодействия моноАТ с РСВ-инфицированными клетками. Монослойные культуры клеток *MA-104*, выращенные в 96-луночных планшетах для культуральных работ (Thermo Scientific—Nunc, Дания), инфицировали РСВ в дозе 100 ТИД₅₀. Через 5—10 дней культивирования при 37° в CO₂-инкубаторе после развития выраженного цитопатического действия (ЦПД) вируса клетки в лунках фиксировали 80%-ным охлажденным ацетоном (ЗАО «Вектон») в течение 20 мин. В лунки с фиксированными клетками добавляли моноАТ, разведенные 5%-ным обезжиренным молоком в ФСБ (ФСБ-М), и инкубировали 2 ч при 37°. После отмывания планшетов детекцию связавшихся с вирусом моноАТ проводили добавлением пероксидазного конъюгата козьих АТ к IgG мыши (Sigma), разведенного ФСБ-М в соотношении 1:5000. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37°. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл ТМБ (Sigma) и 0,02%-ную H₂O₂ в ацетат-цитратном буфере (ЗАО «ЛенРеактив»), pH 5,0. Остановку реакции осуществляли 2 н. H₂SO₄ (ЗАО «ЛенРеактив»). Оптическую плотность измеряли на фотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Оценка вируснейтрализующей активности моноАТ. Двукратные разведения моноАТ (50 мкл) от 1:10 до 1:2560 соединяли с равными объемами ВКЖ, содержащей 100 ТИД₅₀ РСВ. 100 мкл смеси вирус + моноАТ инкубировали 2 ч при 37°, после чего вносили в лунки вместе с отмытым ФСБ монослоем клеток культуры *MA-104* (коллекция клеток лаборатории клеточных культур НИИ гриппа), выращенных в 96-луночных планшетах для культуральных работ. Планшеты выдерживали 5—7 дней в CO₂-инкубаторе до развития выраженного ЦПД в контрольных лунках (100 ТИД₅₀ вируса без добавления моноАТ). После этого КЖ удаляли, клетки фиксировали в течение 20 мин 80%-ным охлажденным ацетоном и промывали ФСБ. Ингибирование синтеза РСВ в присутствии моноАТ учитывали в мк-ИФА. Для этого использовали разведенный ФСБ-М 1:2000 пероксидазный конъюгат моноАТ 9С5 (см. раздел «Результаты и обсуждение»), специфичных к РСВ. Конечный нейтрализующий титр моноАТ определяли по наименьшей концентрации АТ, при которой наблюдалось не менее чем двукратное снижение ОП₄₅₀ по сравнению с контролем (нормальная репродукция вируса).

Приготовление конъюгатов моноАТ с пероксидазой хрена (моноАТ-Пх) осуществляли периодатным методом [17].

Конкурентный ИФА. Планшеты для ИФА («Медполимер», С.-Петербург) сенсibilизировали при 4° в течение 18 ч очищенным концентратом РСВ, штамм Long (5 мкг/мл). Различные сочетания моноАТ-Пх и немеченных моноАТ (десятикратные разведения на ФСБ-М) смешивали в равных объемах (50 мкл). 100 мкл смеси переносили в лунки с РСВ. Планшеты инкубировали 18 ч при 4°. Положительным контролем (100%-ное взаимодействие вирус—моноАТ) служили пробы, в которые кроме вируса вносили только моноАТ-Пх. Отрицательным контролем считали пробы без добавления вируса. Степень ингибирования связывания моноАТ-Пх с РСВ в присутствии немеченных моноАТ (%) определяли по формуле:

$$\left(1 - \frac{\text{ОП}_{450 \text{ тест}} - \text{ОП}_{450 \text{ K}^-}}{\text{ОП}_{450 \text{ K}^+} - \text{ОП}_{450 \text{ K}^-}}\right) \cdot 100\%,$$

где ОП_{450 тест} — ОП₄₅₀ тестируемой пробы при добавлении к РСВ смеси моноАТ-Пх + немеченные моноАТ; ОП_{450 K⁻} — ОП₄₅₀ образцов с РСВ без добавления моноАТ + моноАТ-Пх; ОП_{450 K⁺} — ОП₄₅₀ образцов с РСВ при добавлении моноАТ-Пх в отсутствие немеченных моноАТ.

Определение изотипа моноАТ проводили в ИФА с использованием набора козьих антиизотипических сывороток против Ig мыши и пероксидазного конъюгата кроличьих АТ, взаимодействующих с козьими IgG (Sigma-Aldrich, США).

Выделение РСВ из клинических материалов в культуре клеток. Для выделения РСВ были использованы назофарингиальные мазки, взятые в первые 2 дня ОРВИ у детей в возрасте от 9 дней до 14 лет, госпитализированных в клиники С.-Петербурга в январе—апреле 2014 г. Наличие антигенов РСВ в исходном клиническом материале было установлено с помощью ПЦР. Выделение и культивирование вирусных изолятов проводили в клеточной культуре *MA-104*, как описано выше для эталонных штаммов РСВ. После развития видимого ЦПД наличие РСВ в культуральной среде было подтверждено с использованием ПЦР.

Постановка ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Для идентификации специфических фрагментов нуклеиновых кислот РСВ использовали наборы реагентов «АмплиСенс-Reverta» и «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» («ИнтерЛабСервис», Москва) в соответствии с инструкцией по применению системы. Для определения принадлежности РСВ к группе А использовали праймеры, предложенные Tan с соавт. [18] в на-

шей модификации. РСВ группы В выявляли с помощью праймеров по результатам проведенного выравнивания с генетическими последовательностями РСВ, представленными в GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате отбора перспективных клонов была получена панель из 6 новых моноАТ (RS-25, 4F2, 5F3, 5H8, 1H3, 5F8), специфически взаимодействующих в ИФА с очищенным концентратом вируса-иммуногена (РСВ, эталонный штамм Long). При этом ни у одного из моноАТ в ИФА не наблюдали перекрестного реагирования с гетерологичными вирусами, а также с клеточными антигенами. Свойства моноАТ были оценены в различных иммунологических реакциях. В качестве референс-препарата при характеристике свойств новых моноАТ использовали моноАТ 9С5, полученные ранее в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа совместно с сотрудниками ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» МЗ РФ. Как было показано ранее с помощью метода конкурентного ингибирования и с использованием референс-моноАТ 131-2А, полученных из Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, Атланта, США), моноАТ 9С5 специфически взаимодействуют с F-белком РСВ [19].

Для характеристики направленности полученных моноАТ был проведен вестерн-блоттинг с использованием в качестве антигена очищенного концентрата РСВ, штамм Long.

В случае проведения электрофореза (ЭФ) с РСВ, обработанным в условиях мягкого нагрева при нередуцирующих условиях (нагревание при 37° без β-МЕ в течение 1,5 ч), после иммуноблоттинга все моноАТ взаимодействовали на НМ с тремя белковыми продуктами, имеющими следующую ММ: 130 кДа, 110 кДа и 70 кДа (рис. 1). Полосе с ММ 70 кДа соответствует мономер поверхностного F-белка РСВ. Согласно данным литературы, две высокомолекулярные полосы представляют олигомерные формы F-гликопротеина РСВ — гомодимерную и гомотримерную [20, 21]. По данным других авторов, высокомолекулярные полосы с близкими ММ на электрофореграмме соответствуют гетероолигомерам двух поверхностных гликопротеинов РСВ — мономеру F-белка (70 кДа) + полностью гликозилированная форма G-белка (90 кДа) и мономеру F-белка (70 кДа) + форма G-белка с неполным гликозилированием (55 кДа) [22]. Размытые контуры высокомолекулярных полос на мембране обусловлены высокой степенью гликозилирования поверхностных белков РСВ, поскольку концентрирование в четкую

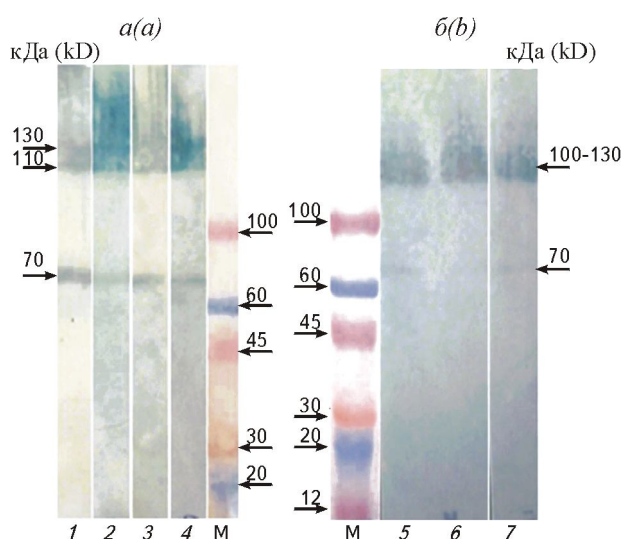


Рис. 1. Взаимодействие моноклональных антител с РСВ после мягкой термической обработки вируса в нередуцирующих условиях (по данным иммуноблоттинга, см. «Условия эксперимента»). Концентрация моноАТ — 5 мкг/мл. Дорожки, а: 1 — моноАТ RS-25; 2 — моноАТ 9С5; 3 — моноАТ 4F2; 4 — моноАТ 5F3; М — маркеры (Sigma Color Burst C1992). Дорожки, б: 5 — моноАТ 5Н8; 6 — моноАТ 1Н3; 7 — моноАТ 5F8; М — маркеры (Sigma Color Burst C1992)

Fig. 1. Interaction of monoclonal antibodies with RSV after soft thermal treatment of the virus under non-reducing conditions (data of immunoblotting, see EXPERIMENTAL section). MCA concentration was 5 µg/ml. Tracks, a: (1), MCA RS-25; (2), MCA 9C5; (3), MCA 4F2; (4), MCA 5F3; M, markers of molecular mass (Sigma Color Burst C1992). Tracks, b: (5), MCA 5H8; (6), MCA 1H3; (7), MCA 5F8; M, MM markers (Sigma Color Burst C1992)

полосу в процессе ЭФ затруднено для гликопротеинов с разветвленными углеводными цепями.

После ЭФ вируса, подвергнутого более жесткой обработке при нередуцирующих условиях (кипячение 2 мин при 100° без β-МЕ), и иммуноблоттинга все моноАТ реагировали на НМ только с мономерной формой F-белка РСВ (70 кДа), что, по-видимому, объясняется распадом олигомеров. На рис. 2 представлен результат, полученный для 4 моноАТ; в остальных случаях картина была идентична приведенной.

На рис. 3 показаны белковые полосы на электрофореграмме РСВ, с репликами которых на НМ реагировали моноАТ.

Как видно из рис. 3, моноАТ не взаимодействовали с РСВ, обработанным в наиболее жестких редуцирующих условиях при кипячении в течение 2 мин в присутствии β-МЕ, что свидетельст-

вует о полном разрушении в этом случае эпитопа-мишени. В целом результаты иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что все полученные моноАТ взаимодействуют с конформационно лабильными эпитопами, присутствующими как в мономерной, так и в олигомерных формах F-белка РСВ.

Существуют различные изотипы IgG, к которым могут относиться моноАТ. МоноАТ 5F8 и 5F3 обладают выраженной вируснейтрализующей активностью до конечных концентраций 9—26 мкг/мл (табл. 1) по отношению к эталонным штаммам РСВ группы А. Для РСВ группы В эта активность была значительно ниже. Слабая нейтрализующая активность была выявлена для моноАТ 5Н8 по отношению к обеим группам РСВ. Остальные моноАТ не оказывали вируснейтрализующего действия (см. табл. 1).

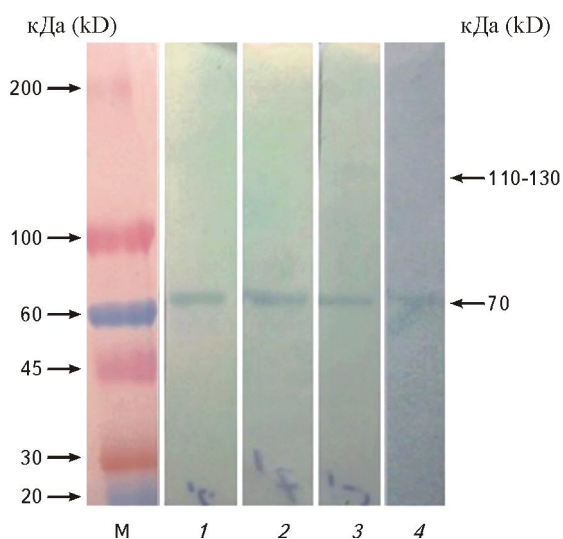


Рис. 2. Взаимодействие моноклональных антител с РСВ после кипячения препарата вируса в нередуцирующих условиях (по данным иммуноблоттинга, см. «Условия эксперимента»). Концентрация моноАТ — 5 мкг/мл. Дорожки: 1 — моноАТ 4F2; 2 — моноАТ 5F3; 3 — моноАТ 5Н8; 4 — моноАТ 1Н3; М — маркеры (Sigma Color Burst C1992)

Fig. 2. Interaction of monoclonal antibodies with RSV after boiling of the virus under non-reducing conditions (data of immunoblotting, see EXPERIMENTAL section). MCA concentration was 5 µg/ml. Tracks: (1), MCA 4F2; (2), MCA 5F3; (3), MCA 5H8; (4), MCA 1H3; M, markers of molecular mass (Sigma Color Burst C1992)

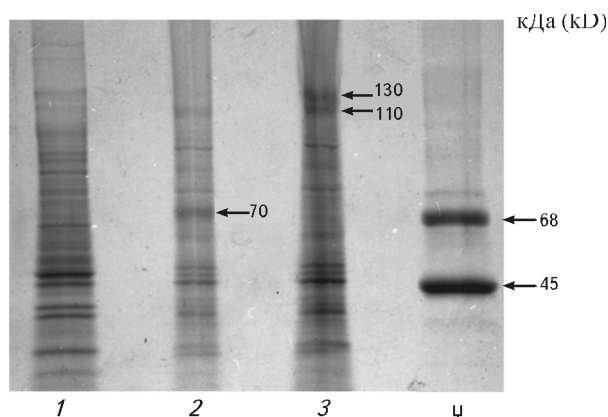


Рис. 3. Белковые полосы на электрофореграмме РСВ, с репликами которых взаимодействовали моноАТ при иммуноблоттинге на НМ. Режим обработки РВ: 1 — кипячение в присутствии β-МЕ в течение 2 мин; 2 — кипячение без β-МЕ в течение 2 мин; 3 — инкубация при 37° без β-МЕ в течение 1,5 ч; М — маркеры ММ (альбумин бычий сывороточный и овалбумин, Sigma)

Fig. 3. Protein bands on electrophoresis of RSV, whose replicas interacted with MCA during immunoblotting on nitrocellulose membranes. Regime of treatment was as follows: (1), boiling with β-ME for 2 min; (2), boiling without β-ME for 2 min; (3), incubation at 37°C without β-ME for 1.5 h; M, markers of molecular mass (bovine serum albumin and ovalbumin, Sigma)

Результаты конкурентного ингибирования моноАТ, меченных и не меченных пероксидазой хрена (табл. 2), показали, что у них наблюдаются следующие 4 особенности взаимодействия с антигеном:

1. МоноАТ 9С5 и RS-25 направлены к одному и тому же эпитопу, поскольку степень конку-

ренции за место связывания на молекуле F-белка между ними достигает 95%;

2. Сайт взаимодействия моноАТ 4F2 в достаточной степени (на 65—70%) перекрывает сайт связывания моноАТ 9С5 и RS-25;

3. МоноАТ 5F3, 5Н8 и 1Н8 не имеют общего сайта взаимодействия с моноАТ 9С5 и RS-25, а

Таблица 1

Характеристика моноАТ, полученных к РСВ
Characteristics of MCA to RSV

МоноАТ MCA	Изотип моноАТ MCA isotype	Нейтрализующая активность моноАТ при взаимодействии со штаммами различных групп РСВ*		
		РСВ-А, штамм Long RSV-A, strain Long	РСВ-А, штамм А2 RSV-A, strain A2	РСВ-В, штамм 9320 RSV-B, strain 9320
9С5	IgG2a	800	800	800
RS-25	IgG2b	350	350	350
4F2	IgG1	500	500	500
5F3	IgG1	16	26	74
5Н8	IgG1	135	135	270
1Н3	IgG1	900	900	900
5F8	IgG2a	9	13	54

*Конечная концентрация моноАТ (мкг/мл), при которой наблюдается нейтрализация анализируемого вируса в инфекционной дозе 100 ТЦД₅₀.

Жирным выделены данные для моноАТ с высокой вируснейтрализующей активностью.

*Final MCA concentration, μg/ml, that provided neutralization of analyzed virus in a dose of 100 TCD₅₀. Data for MCA with high virus-neutralizing activity are typed bold.

Конкурентные взаимодействия моноклональных антител с F-белком РСВ, штамм Long (по данным конкурентного ИФА)
Competitive interactions of monoclonal antibodies with RSV strain Long F protein (data of competitive ELISA)

МоноАТ-Пх MCA-Peroxidase	Степень ингибирования, %, при взаимодействии с РСВ смеси моноклональных антител, меченных и не меченных пероксидазой хрена Rate of inhibition, %, of RSV interaction with MCA labeled or unlabeled by peroxidase						
	МоноАТ MCA	9С5-Пх	RS25-Пх	4F2-Пх	5F3-Пх	5Н8-Пх	1Н3-Пх
9С5		90	95	70	5	0	4
RS-25		95	89	67	25	0	17
4F2		65	69	89	51	37	48
5F3		5	4	42	75	5	2
5Н8		2	4	40	5	74	9
1Н3		2	3	37	0	0	82
5F8		0	0	0	0	Нет данных No data	0

Примечание: Степень ингибирования, %: ■ 80—100%; ▨ 60—79%; ▩ 30—59%; □ <30%.

также не конкурируют друг с другом за связь с F-белком. Однако эти моноАТ направлены к детерминантам, частично (на 37—51%) общим с сайтом связывания для моноАТ 4F2;

4. Сайт взаимодействия моноАТ 5F8 не имеет общих детерминант с сайтами связывания всех остальных моноАТ.

Таким образом, 7 проанализированных моноАТ имеют антигенную направленность к 6 различным конформационно зависимым эпитопам F-белка, 3 из которых индуцируют синтез вируснейтрализующих АТ.

Как уже говорилось и как было показано ранее посредством ИФА с панелями моноАТ к F- и G-белкам РСВ [23, 24], штаммы РСВ существуют в виде одного серотипа, но подразделяются на две антигенные группы (РСВ-А и РСВ-В). Степень различий аминокислотных последовательностей между двумя группами сильно варьирует для различных белков РСВ. F-гликопротеин относится к наиболее консервативным белкам вируса. Структурная гомология среди изолятов РСВ составляет в среднем 91%. Наиболее вариabельным является G-белок — 53% гомологии аминокислотных последовательностей между эталонными штаммами РСВ из групп А и В [25—27]. Тем не менее, изоляты РСВ в пределах каждой антигенной группы ха-

рактеризуются генетической вариabельностью и подразделяются на множество генотипов [28].

Выше было сказано, что отсутствие формирования эффективного долгосрочного противовирусного иммунитета — характерная черта патогенеза РСВИ. В этой связи реинфекции РСВ — обычное явление даже для взрослых людей на фоне высокого содержания в крови вирусспецифических АТ [29]. Показано, что формирующийся у детей анти-РСВ адаптивный иммунный ответ носит зачастую группо- или даже штаммоспецифический характер. Так, у 20% детей наблюдались РСВ-реинфекции в течение одного и того же эпидемического сезона. При этом в 80% случаев возбудителями повторных заболеваний служили РСВ гетерологичной антигенной группы или генотипа [30]. Есть данные о том, что заболевание, вызванное РСВ из группы В, протекает тяжелее, чем в случае инфицирования РСВ группы А [31].

В связи с вышесказанным, своевременная детекция и типирование штаммов РСВ, вызвавших заболевание в детских коллективах и среди госпитализированных пациентов, имеет помимо научного интереса практическое значение и может способствовать снижению риска нозокомиальных реинфекций гетерологичными штаммами вируса при условии изоляции больных. Получение

моноАТ, эффективно взаимодействующих с РСВ обеих антигенных групп, и создание на их основе простых быстрых тестов для дифференциальной диагностики РСВИ призвано облегчить решение проблемы диагностики и лечения тяжелых форм РСВИ, а также уменьшения риска возникновения осложнений.

Для оценки способности полученных моноАТ взаимодействовать со штаммами РСВ, относя-

щимися к различным антигенным группам, был разработан вариант мк-ИФА с использованием многослойных культур инфицированных клеток. При постановке метода были использованы 3 эталонных штамма РСВ: Long и А2 (РСВ-А), а также штамм 9320 (РСВ-В).

Все моноАТ специфически реагировали в ИФА с инфицированными данными вирусами клетками *МА-104* (рис. 4). Фоновые значения

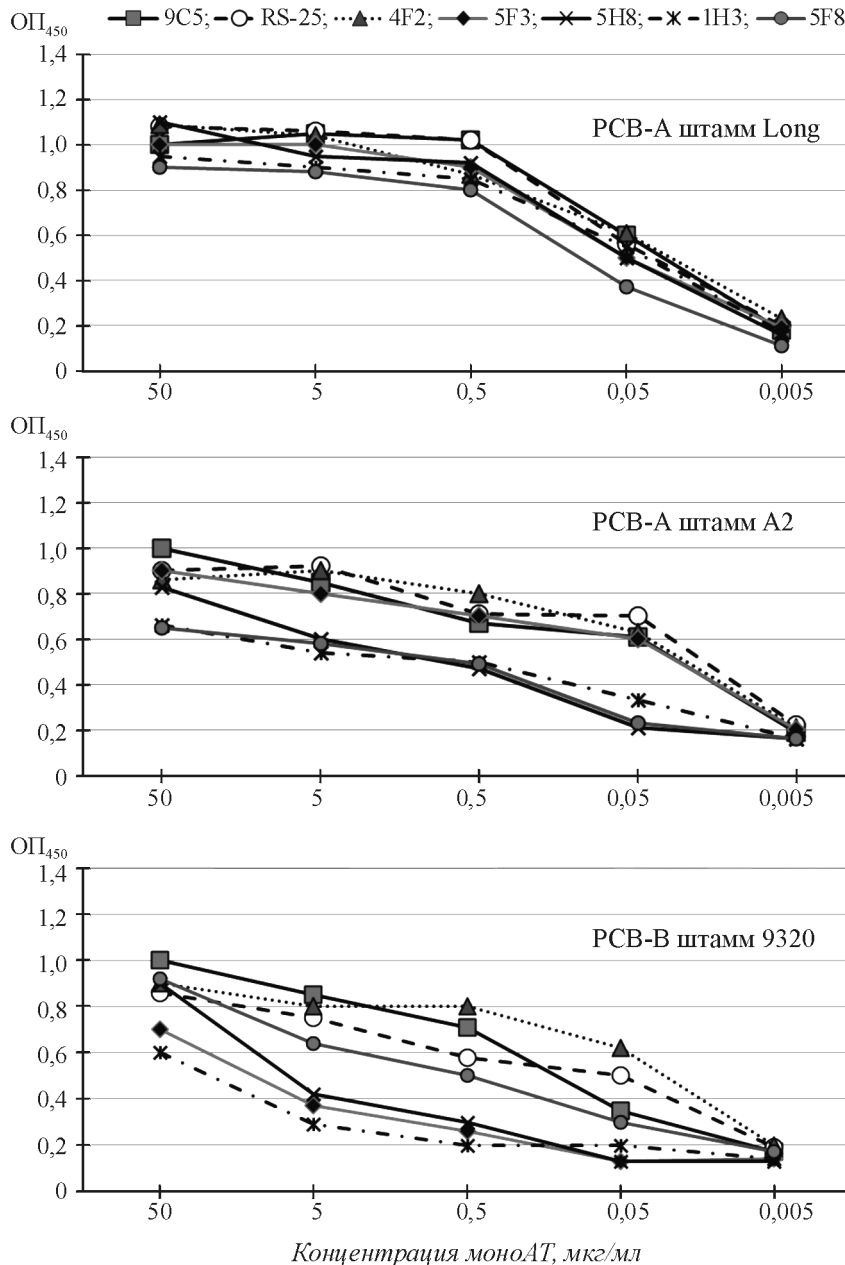


Рис. 4. Взаимодействие моноклональных антител с клетками *МА-104*, инфицированными эталонными штаммами РСВ (по данным микрокультурального ИФА)

Fig. 4. Interaction of monoclonal antibodies with *MA-104* cells infected by reference RSV strains (data of microcultural ELISA). X axis, MCA concentration, µg/ml; Y axis, OD₄₅₀

ОП₄₅₀ при взаимодействии моноАТ с монослойными культурами неинфицированных клеток не превышали 0,15. Все полученные моноАТ практически с одинаковой эффективностью взаимодействовали в мк-ИФА с вирусом-иммуногеном штамма Long. На высокое сродство моноАТ к данному вирусу указывает наличие плато на кривых титрования, наблюдаемое в широком диапазоне концентраций моноАТ — от 0,5 до 50 мкг/мл. С клетками, инфицированными другим штаммом РСВ-А (А2), все моноАТ взаимодействовали слабее, чем с РСВ Long. Наименее активными при этом оказались моноАТ 5Н8, 1Н3 и 5F8. Эти же 3 моноАТ значительно слабее, чем другие антитела, реагировали также со штаммом 9320, относящимся к гетерологичной группе В. Следует отметить, что 5F3 оказались единственными из полученных моноАТ, которые реагировали с эталонными штаммами группы РСВ-А со значительно большей активностью, чем с РСВ-В (см. рис. 4).

Полученные результаты указывают на то, что моноАТ 9С5, RS-25 и 4F2 направлены к консервативным эпитопам F-белка, общим для обеих антигенных групп РСВ, в отличие от моноАТ 5Н8, 1Н3, 5F8 и 5F3, которые взаимодействуют с более переменными эпитопами. Интересно, что вируснейтрализующей активностью обладают моноАТ, синтез которых был индуцирован переменными, а не общими для вирусов из различных антигенных групп консервативными детерминантами F-белка РСВ. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что такая особенность формирова-

ния АТ может быть одной из причин группо- и штаммоспецифического характера адаптивного иммунного ответа на инфицирование РСВ, который обуславливает слабую протективную активность нейтрализующих АТ против циркулирующих антигенно измененных штаммов и отсутствие долгосрочного эффективного иммунного ответа на РСВИ.

Поскольку моноАТ 4F2 одинаково эффективно взаимодействовали с РСВ обеих групп (в отличие от моноАТ 5F3, которые активны преимущественно в отношении РСВ-А), было выдвинуто предположение о том, что методом мк-ИФА с использованием двух данных моноАТ можно проводить групповую антигенную дифференцировку новых штаммов РСВ, изолированных в культуре клеток. Это предположение было подтверждено при анализе штаммов, выделенных из клинических материалов, полученных от детей с ОРВИ, госпитализированных в клиники С.-Петербурга в 2014 г. С помощью мк-ИФА была оценена групповая принадлежность 30 изолятов РСВ. Согласно данным ПЦР, 25 из них были отнесены к группе А, а 5 штаммов — к группе В.

По результатам мк-ИФА, активность взаимодействия (ОП₄₅₀) моноАТ 5F3 (в рабочем разведении 0,5 мкг/мл) с клетками, инфицированными штаммами РСВ-В, была на 50—60% ниже, чем в случае штаммов, принадлежащих к группе А (рис. 5). Напротив, моноАТ 4F2 одинаково эффективно реагировали с РСВ обеих антигенных групп. При этом значения ОП₄₅₀ при взаимодействии изо-

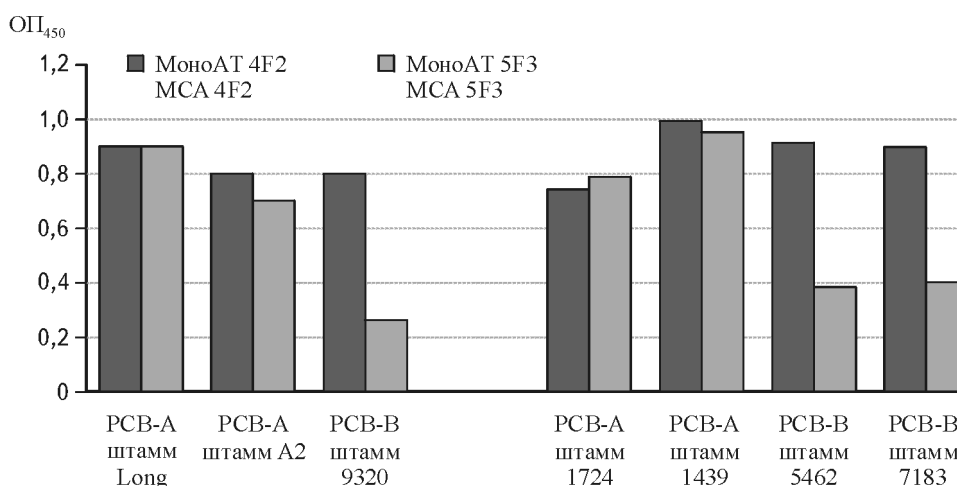


Рис. 5. Антигенное типирование изолятов РСВ с использованием моноАТ 4F2 и 5F3 (по данным микрокультурального ИФА с клетками MA-104); моноАТ использовали в рабочем разведении 0,5 мкг/мл, инфицирование изолятами РСВ проводили в дозе 100 ТЦД₅₀

Fig. 5. Antigenic typing of RSV isolates using 4F2 and 5F3 monoclonal antibodies (data of microcultural analysis with MA-104 cells); MCA were used in a working dilution of 0.5 mg/ml; infection by isolates was performed in a dose of 100 TCD₅₀. Y axis, OD₄₅₀

лятов РСВ-В с моноАТ 5F3 были в 4—2,5 раза ниже показателей, полученных для моноАТ 4F2. Результаты мк-ИФА полностью соответствовали данным ПЦР.

Таким образом, сравнение с помощью мк-ИФА эффективности взаимодействия моноАТ 4F2 и 5F3 с РСВ позволяет установить принадлежность анализируемых штаммов к одной из двух антигенных групп.

Полученные результаты показывают возможность использования полученной панели моноАТ для детекции РСВ различными иммунологическими и вирусологическими методами, а также (в совокупности с данными ПЦР) охарактеризовать генетическую и антигенную вариабельность современных циркулирующих штаммов.

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Получены и охарактеризованы свойства 6 новых моноАТ, специфичных к РСВ, которые взаимодействуют с конформационно лабильными эпитопами, присутствующими как в мономерной, так и в олигомерных формах F-белка РСВ;

2. Полученные моноАТ направлены к 6 различным конформационно зависимым эпитомам F-белка РСВ, 3 из которых индуцируют вируснейтрализующие антитела. Вируснейтрализующей активностью обладают моноАТ, синтез которых индуцирован вариабельными, а не консервативными детерминантами F-белка РСВ;

3. Сравнение эффективности взаимодействия моноАТ 4F2 и 5F3 с РСВ в ИФА позволяет установить принадлежность штаммов, выделенных из клинических материалов, к одной из двух антигенных групп (РСВ-А или РСВ-В).

Получено 9.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Simoës, E.A.* Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries / E.A. Simoës, X. Carbonell-Estrany // *Pediatr. Infect. Dis. J.* — 2003. — V. 22(2 Suppl). — P. S13—20.
2. *Nair, H.* Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis / H. Nair, D.J. Nokes, B.D. Gessner, M. Dherani, S.A. Madhi, R.J. Singleton, K.L. O'Brien, A. Roca, P.F. Wright, N. Bruce, A. Chandran, E. Theodoratou, A. Sutanto, E.R. Sedyaningih, M. Ngama, P.K. Munywoki, C. Kartasmita, E.A. Simões, I. Rudan, M. Weber, H. Campbell // *Lancet.* — 2010. — V. 375(9725). — P. 1545—1555.
3. *Karron, R.A.* Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus vaccines: Vaccines, Sixth edition [Eds. S.A. Plotkin, W.A. Orenstein, P.A. Offit]. — Philadelphia, US: Elsevier Inc. Saunders, 2012. — P. 1146—1153.
4. *Mukherjee, S.* Innate immune responses to respiratory syncytial virus infection / S. Mukherjee, N. Lukacs // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2013. — V. 372. — P. 139—154.
5. *Varga, S.M.* The adaptive immune response to respiratory syncytial virus / S.M. Varga, T. J. Braciale // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2013. — V. 372. — P. 155—171.
6. *Gomez, R.S.* Respiratory Syncytial Virus: pathology, therapeutic drugs and prophylaxis / R.S. Gomez, I. Guisles-Marsollier, K. Bohmwald, S.M. Bueno, A.M. Kalergis // *Immunol. Lett.* — 2014. — V. 162(1 Pt A). — P. 237—247.
7. *Wright, M.* Respiratory syncytial virus prevention and therapy: past, present, and future / M. Wright, G. Piedimonte // *Pediatr. Pulmonol.* — 2011. — V. 46(4). — P. 324—347.
8. *Knudson, C.J.* The relationship between respiratory syncytial virus and asthma / C.J. Knudson, S.M. Varga // *Vet. Pathol.* — 2015. — V. 52(1). — P. 97—106.
9. *Чучалин А.Г.* Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы / А.Г. Чучалин, Т.П. Оспельникова, Г.Л. Осипова, Н.В. Лизогуб., В.Б. Гервазиева, В.З. Кривицкая, С.С. Григорян, С.А. Мазурина, Е.Б. Файзулов, А.А. Никонова, В.Н. Панкратова, С.А. Гончарова // *Пульмонология.* — 2007. — № 5. — С. 14—18.
10. *Traves, S.L.* Viral-associated exacerbations of asthma and COPD / S.L. Traves, D. Proud // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2007. — V. 7(3). — P. 252—258.
11. *Gomez, R.S.* Respiratory syncytial virus detection in cells and clinical samples by using three new monoclonal antibodies / R.S. Gomez, J.E. Mora, C.M. Corte's, C.A. Riedel, M. Ferre's, S.M. Bueno, M. Kalergis // *J. Med. Virol.* — 2014. — V. 86(7). — P. 1256—1266.
12. *Luchsinger, V.* Human respiratory syncytial virus genomic and antigenic variants isolated in two hospitals during one epidemic, in Santiago, Chile / V. Luchsinger, A.E. Noy, L.F. Avendaño // *J. Clin. Virol.* — 2008. — V. 42(3). — P. 260—263.
13. *Adams, O.* Genetic analysis and antigenic characterization of human respiratory syncytial virus group A viruses isolated in Germany 1996-2008 / O. Adams, J. Werzmirzowsky, H. Hengel // *Virus Genes.* — 2013. — V. 47(2). — P. 210—218.
14. *Orvell, C.* Structural polypeptides of mumps virus // *J. Gen. Virol.* — 1978. — V. 41(3). — P. 527—539.
15. *Köhler, G.* Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion / G. Köhler, C. Milstein // *Eur. J. Immunol.* — 1976. — V. 6(7). — P. 511—519.
16. *Laemmli, U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.* — 1970. — V. 227. — P. 680—685.
17. *Nakane, P.K.* Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation / P.K. Nakane, A. Kawaoi // *J. Histochem. Cytochem.* — 1974. — V. 22(12). — P. 1084—1091.

18. *Tan, L.* Genetic variability among complete human respiratory syncytial virus subgroup A genomes: bridging molecular evolutionary dynamics and epidemiology / L.Tan, P. Lemey, L. Houspie, M.C. Viveen, N.J. Jansen, A.M. van Loon, E. Wiertz, G.M.van Bleek, D.P. Martin, F.E. Coenjaerts // *PLoS One*. — 2012. — V.7(12). — e51439.
19. *Соминина А.А.* Характеристика моноклональных антител к РС-вирусу в иммуноферментных и иммунофлуоресцентных реакциях / А.А. Соминина, Л.П. Сухубаевская, М.П. Самойлович, В.Б. Климович, А.О. Монаенков, И.В. Амосова, И.А. Маркина, С.Д. Бубнова, Э.А. Зибина, И.В. Острова // *Вестник РАМН*. — 1995. — № 9. — С. 49—54.
Sominina, A.A. Characteristics of Monoclonal Antibodies to RS virus in Immunoenzyme and Immunofluorescent Reactions / A.A. Sominina, L.P. Sukhubaevskaya, M.P. Samoilovich, V.B. Klimovich, A.O. Monaenkov, I.V. Amosova, I.A. Markina, S.D. Bubnova, E.A. Zibina, and I.V. Ostrova // *Vestnik RAMN (Journal of Russ. Acad. Med. Sci.)*. — 1995. — N 9. — P. 49—54.
20. *Collins, P.L.* Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus / P.L. Collins, G. Mottet // *J. Gen. Virol.* — 1991. — V. 72(Pt.12). — P.3095—3101.
21. *Rixon, H.W.* Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus-infected cells / H.W. Rixon, C. Brown, G. Brown, R.J. Sugrue // *J. Gen. Virol.* — 2002. — V. 83(Pt. 1). — P.61—66.
22. *Arumugham, R.G.* Interprotein disulfide bonding between F and G glycoproteins of human respiratory syncytial virus / R.G. Arumugham, S.W. Hildreth, P.R. Paradiso // *Arch. Virol.* — 1989. — V. 105(1—2). — P. 65—79.
23. *Anderson, L.J.* Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies / L.J. Anderson, J.C. Hierholzer, C. Tsou, R.M. Hendry, B.F. Femie, Y. Stone, K. McIntosh // *J. Infect. Dis.* — 1985. — V. 151(4). — P. 626—633.
24. *Johnson, P.R.* Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity / P.R. Johnson., R.A. Olmsted, G.A. Prince, B.R. Murphy, D.W. Alling, E.E. Walsh, P.L. Collins // *J. Virol.* — 1987. — V. 61(10). — P. 3163—3166.
25. *Johnson, P.R.* The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins / P.R. Johnson, M.K. Spriggs, R.A. Olmsted, P.L. Collins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1987. — V. 84(16). — P. 5625—5629.
26. *Johnson, P.R.* The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness / P.R. Johnson, P.L. Collins // *J. Gen. Virol.* — 1988. — V. 69(Pt. 10). — P. 2623—2628.
27. *Johnson, P.R.* The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA / P.R. Johnson, P.L. Collins // *J. Gen. Virol.* — 1989. — V. 70. — P. 1539—1547.
28. *Melero, J.A.* Influence of respiratory syncytial virus strain differences on pathogenesis and immunity / J.A. Melero, M.L. Moore // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2013. — V.72. — P. 59—82.
29. *Hall, C.B.* Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus / C.B. Hall, E.E. Walsh, C.E. Long, K.C. Schnabel // *J. Infect. Dis.* — 1991. — V.163. — P. 693—698.
30. *Agoti, C.N.* Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya / C.N. Agoti, A.G. Mwihuri, C.J. Sande, C.O. Onyango, G.F. Medley, P.A. Cane, D.J. Nokes // *J. Infect. Dis.* — 2012. — V. 206. — P. 1532—1541.
31. *Hall, C.B.* Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children / C.B. Hall, E.E. Walsh, K.C. Schnabel, C.E. Long, K.M. McConnochie, S.W. Hildreth, L.J. Anderson // *J. Infect. Dis.* — 1990. — V. 162. — P.1283—1290.

V.Z. KRIVITSKAYA*, E.R. PETROVA, E.V. SOROKIN, T.R. TSAREVA, M.V. SVERLOVA, A.V. FADEEV, A.B. KOMISSAROV, and A.A. SOMININA

The Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russian Federation, 197376, St.-Petersburg Russia

e-mail: vera.kriv@influenza.spb.ru

Design and Characteristics of Monoclonal Antibodies Specific to Respiratory Syncytial Virus

An antibody panel that includes 6 MCA specifically interacting in ELISA with RSV strains of both existing antigenic groups (A and B) has been designed. The new MCA are directed to 6 different conformation-dependent F protein epitopes, 3 of them inducing the synthesis of virus-neutralizing antibodies. Using real-time PCR with reverse transcription, immunoblotting, identification of MCA virus-neutralizing activity, competitive ELISA and cell-ELISA, it was shown that only the MCA whose synthesis was induced by variable RSV F protein determinants (unlike MCA directed to conservative determinants that are common for the viruses of various antigenic groups) have the virus-neutralizing activity. Differences in the interaction between RSV, MCA 4F2 and MCA 5F3 make it possible to identify by cell-ELISA of antigen group (RSV-A or RSV-B) of strains isolated from clinical samples.

Key words: antigenic typing, cell-ELISA, monoclonal antibodies, respiratory syncytial virus.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 1, P.65—75.

* Author for correspondence.