

Г.В.Куклина, О.О.Фоменков, Г.Д.Елагин, Д.А.Кутаев, Д.С.Янов, А.А.Кытманов, Н.В.Богачева, Т.П.Воробьева, И.В.Дармов, Д.В.Печенкин

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* СЕРОГРУППЫ 1

Научно-исследовательский центр биологической защиты «33 Центрального научно-исследовательского испытательного института Министерства обороны Российской Федерации», Киров

Разработана высокочувствительная и специфичная иммуноферментная тест-система, перспективная для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1. Получены 3 стабильные гибридные клеточные линии, секретирующие моноклональные антитела к специфическим эпитопам липополисахаридного антигена *L. pneumophila* серогруппы 1. С использованием липополисахаридного антигена получены гипериммунные кроличьи сыворотки, характеризующиеся высокой специфической активностью и специфичностью.

Ключевые слова: легионеллез, липополисахаридный антиген, моно- и поликлональные антитела, иммуноферментный анализ.

G.V.Kuklina, O.O.Fomenkov, G.D.Elagin, D.A.Kutaev, D.S.Yanov, A.A.Kytmanov, N.V.Bogacheva, T.P.Vorob'eva, I.V.Darmov, D.V.Pechenkin

Development of the Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of *Legionella pneumophila*, Serogroup I

Research Centre of Biosecurity of the "33rd Central Research and Probation Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation", Kirov

Developed is the highly sensitive and specific immuno-enzyme test-system, which is perspective for the detection of *L. pneumophila*, serogroup 1. Isolated are the three hybrid cell lines that secrete monoclonal antibodies to specific epitopes of *L. pneumophila*, serogroup 1 lipopolysaccharide antigen. Hyper immune rabbit sera, characterized by highly specific activity and specificity, are obtained using lipopolysaccharide antigen.

Key words: legionellosis, lipopolysaccharide antigen, mono- and polyclonal antibodies, enzyme immunoassay.

Болезнь легионеров – острое инфекционное заболевание, вызываемое группой микроорганизмов, относящихся к семейству *Legionellaceae*, характеризующееся воздушно-капельным механизмом передачи возбудителя и протекающее в виде лихорадки с поражением верхних и нижних дыхательных путей [2, 4].

Ежегодно в мире регистрируется от 10 до 25 тыс. случаев заболевания легионеллезом, из которых до 20 % заканчиваются летально. Болезнь распространена повсеместно, наибольшее количество случаев выявляется в странах Европы и США, и часто носят эпидемический характер [1, 3]. В Российской Федерации легионеллез регистрируется на уровне от 10 до 30 спорадических и отдельных групповых вспышек в год. Однако данная инфекция может составлять до 14 % в этиологической структуре всех пневмоний [4]. В связи со сходством клинических проявлений легионеллезной и пневмококковой пневмонии, быстрая и эффективная лабораторная диагностика приобретает решающее значение для выбора тактики этиотропной терапии больных и проведения противоэпидемических мероприятий в очаге.

Наиболее распространенными источниками заражения легионеллезом являются колонизированные возбудителем искусственные водные системы, к которым относятся системы горячего и холодного водоснабжения, централизованные системы кондиционирования воздуха с водным охлаждением, градирни

и т.д. В таких системах происходит накопление легионелл в высоких концентрациях и создаются условия для образования в воздухе мелкодисперсного бактериального аэрозоля, что приводит к риску эпидемического распространения возбудителя. Это обстоятельство предопределяет актуальность контроля концентрации легионелл в этих системах [4].

На сегодняшний день известно 50 видов легионелл, для 22 из которых показана роль в инфекционной патологии человека. Однако более 95 % случаев заболевания легионеллезом связаны с видом *L. pneumophila*, который представлен 16 серогруппами. При этом более 80 % случаев заболевания связаны со штаммами серогруппы 1. Необходимо отметить, что летальные исходы при легионеллезной инфекции также преимущественно ассоциированы с первой серогруппой данного вида возбудителя [4].

Таким образом, выявление *L. pneumophila* серогруппы 1 является актуальной задачей, для решения которой с успехом могут быть использованы такие общепринятые современные средства быстрого обнаружения микроорганизмов, как иммуноферментные тест-системы.

Целью работы явилось получение специфических легионеллезных моно- и поликлональных антител и разработка на их основе иммуноферментной тест-системы для обнаружения легионеллезного микроба серогруппы 1.

Материалы и методы

Липополисахаридный антиген, используемый для иммунизации животных и сенсибилизации планшетов, получали из биомассы микробной культуры *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*, выращенной на угольно-дрожжевом агаре в течение трех суток при температуре 37 °С. За основу получения антигенного препарата была взята методика Jonson W. и соавт. [7]. Исследование специфической активности полученного антигенного препарата проводили в реакции диффузионной преципитации (РДП) [4] с монорецепторной кроличьей сывороткой против *L. pneumophila* серогруппы 1.

С целью получения гипериммунных кроличьих сывороток к липополисахаридному антигену было использовано 5 кроликов. Животных иммунизировали путем подкожного и внутривенного введения антигенного препарата по модифицированной нами схеме, состоящей из четырех этапов. Изучение динамики титров антител в сыворотке крови животных проводили с использованием «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Специфическую активность и специфичность полученных сывороточных препаратов оценивали в ИФА с близкородственными легионеллами (*L. pneumophila* серогрупп 2, 3, 5 и 6, *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii* и рядом гетерологичных микроорганизмов (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*).

С целью получения гибридом-продуцентов моноклональных антител (МКАт) к специфическим эпитопам *L. pneumophila* серогруппы 1 иммунизацию мышей линии *BALB/c* проводили путем подкожного введения возрастающих доз инактивированной микробной культуры *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*.

Гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками миеломы *SP2/0-Ag-14* осуществляли на четвертые сутки после заключительной иммунизации с использованием 50 % раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ 1560 «Sigma», США) по общепринятой методике [6].

Скрининг первичных гибридных клонов с использованием поверхностного липополисахаридного антигена проводили, начиная с 10-х суток культивирования трижды с интервалом 2–3 дня, а скрининг антителопродуцирующих гибридных линий – на 12-е сутки после клонирования. Второе и третье тестирование всех первично-позитивных культур проводили, кроме того, с использованием вышеперечисленных близкородственных легионелл и гетерологичных микроорганизмов.

Для получения асцитической жидкости мышам линии *BALB/c* интраперитонеально вводили сначала по 0,3 мл пристана («Sigma», США), а через 14 сут – от 2 до 4 млн гибридных клеток. Полученные асци-

тические жидкости исследовали в ИФА.

Планшеты для постановки ИФА сенсибилизировали липополисахаридным антигеном в концентрации 2 мкг/мл, а также вышеперечисленными близкородственными легионеллами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации 100 млн м.к./мл. Кроличьи сыворотки титровали двукратным шагом с разведения 1:100 до 1:409600, культуральную и асцитическую жидкости – с 1:5000 до 1:5120000. Антивидовые конъюгаты против IgG кролика и IgG мыши («Sigma», США) применяли в рабочем разведении. В качестве субстрата использовали о-фенилендиамин («Sigma», США). Оптическую плотность субстратно-индикаторной смеси измеряли на фотометре Multiscan («Thermo Scientific», США) при длине волны 492 нм.

Выделение иммуноглобулинов из асцитических жидкостей мышей и гипериммунных сывороток кроликов осуществляли двукратным осаждением насыщенным раствором сульфата аммония с последующей очисткой препаратов моно- и поликлональных антител путем ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-цефацеле («Sigma», США).

Синтез конъюгатов легионеллезных моно- и поликлональных антител с пероксидазой хрена («Sigma», США) проводили с использованием перйодатного окисления [8]. Рабочее разведение иммунопероксидазных конъюгатов определяли методом «шахматного» титрования.

Для определения оптимальной сенсибилизирующей дозы поликлональных антител в лунки 96-луночного планшета вносили раствор иммуноглобулинов в концентрации от 0,062 до 40 мкг/мл белка в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С.

Лиофилизацию иммунологически активных компонентов тест-системы осуществляли в защитной среде высушивания, содержащей 7,5 % сахарозы, в течение (20±1) ч.

Экспериментальное исследование чувствительности сконструированной тест-системы проводили с использованием штаммов *L. pneumophila* серогруппы 1. Изучение специфичности тест-системы проводили в отношении близкородственных легионелл, а также ряда гетерологичных микроорганизмов.

Результаты и обсуждение

Полученные препараты липополисахаридного антигена в РДП с легионеллезной монорецепторной кроличьей сывороткой формировали линии преципитации при разведении от 1:16 до 1:64.

В опыте по получению гипериммунных кроличьих сывороток после первых трех этапов наблюдалась положительная динамика накопления сывороточных антител к липополисахаридному антигену. Четвертый этап характеризовался незначительной сероконверсией. В результате были получены сывороточные препараты, характеризующиеся высоким

Таблица 1

Чувствительность ИФА при выявлении *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* в условиях постановки реакций с использованием разных комбинаций специфических моно- и поликлональных антител

Антитела, используемые в качестве сенситина	Чувствительность ИФА при выявлении <i>L. pneumophila</i> штамма <i>Philadelphia-1</i> с использованием иммунопероксидазного конъюгата, приготовленного на основе препарата, м.к./мл ($X_{геом} \times \text{antig I}_{95,lg}$)				
	МКАт гибридной клеточной линии			поликлональных антител	
	149Н7В1	147Е5А10	142Н12В7		
МКАт гибридной клеточной линии	149Н7В1	Н	$8,57 \cdot 10^5 \times 1,35$	$2,99 \cdot 10^6 \times 1,22$	$7,21 \cdot 10^5 \times 1,65$
	147Е5А10	$8,28 \cdot 10^5 \times 1,80$	Н	$1,75 \cdot 10^6 \times 1,26$	$1,00 \cdot 10^5 \times 1,11$
	142Н12В7	$3,10 \cdot 10^6 \times 1,08$	$1,60 \cdot 10^6 \times 1,18$	Н	$1,84 \cdot 10^6 \times 1,29$
Поликлональные		$7,73 \cdot 10^5 \times 1,66$	$0,97 \cdot 10^5 \times 1,05$	$1,71 \cdot 10^6 \times 1,22$	$3,73 \cdot 10^5 \times 1,34$

Примечание. Н – невозможно выявление *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* при данном сочетании; во всех случаях n=20.

уровнем титров антител к иммуногену (от 1:102400 до 1:409600). При исследовании полученных сывороток методом ИФА с культурами близкородственных легионелл и гетерологичных микроорганизмов перекрестных реакций не выявлено.

В результате трех опытов по слиянию иммунных спленоцитов и миеломных клеток получено 98 первично-позитивных культур, продуцирующих МКАт к липополисахаридному антигену и не взаимодействующих с гетерологичными микроорганизмами. С целью отбора наиболее перспективных для клонирования первично-позитивных культур оценивали морфологию растущих гибридных клеток, их пролиферативную активность, а также способность сохранять высокий уровень синтеза специфических моноклональных антител. В итоге были отобраны 10 первично-позитивных культур, которые подвергли клонированию методом лимитирующих разведений. По результатам оценки пролиферативной активности и стабильности антителопродукции отобраны 9 гибридом, которые затем были использованы для работы МКАт *in vivo*.

По результатам ИФА, наиболее выраженный уровень продукции МКАт в титрах от 1:640000 до 1:2560000 был отмечен у трех гибридных клеточных линий: 149Н7В1, 147Е5А10, 142Н12В7, которые характеризовались высокой стабильностью своих основных свойств в процессе культивирования *in vivo*.

С целью выбора препаратов моно- и поликлональных антител, обеспечивающих наиболее высокую эффективность иммуноферментных реакций, направленных на выявление *L. pneumophila* серогруппы 1, опробованы в качестве сенситина и основы для приготовления иммунопероксидазных конъюгатов различные комбинации специфических моно- и поликлональных антител (табл. 1).

Результаты ИФА были отрицательными при использовании в качестве сенситина и основы иммунопероксидазного конъюгата МКАт одной гибридомы, что можно объяснить одноэпитопной направленностью антител. Высокая чувствительность ИФА к *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* обеспечивается при сочетании поликлональных антител в качестве сенситина и МКАт, продуцируемых гибридомой 147Е5А10, как основы для иммунопероксидазного конъюгата. Таким образом, при конструировании

тест-системы были использованы поликлональные антитела в качестве сенситина и меченные пероксидазой МКАт гибридной клеточной линии 147Е5А10.

В результате оценки влияния сенсibiliзирующей дозы поликлональных антител на чувствительность и воспроизводимость ИФА установлено, что полный уровень сенсibiliзации планшета в течение 1 ч при температуре 37 °С обеспечивается при концентрации иммуноглобулинов 10 мкг/мл. Увеличение концентрации антител до 40 мкг/мл к повышению чувствительности не приводило, а применение иммуноглобулинов в концентрации 5 мкг/мл и менее не обеспечивало воспроизводимости ИФА.

Исследование чувствительности и специфичности сконструированной иммуноферментной тест-системы показало, что препарат обеспечивал выявление штаммов *L. pneumophila* серогруппы 1 в концентрации 100 тыс м.к./мл, а также не давал ложных положительных результатов при исследовании близкородственных легионелл и ряда гетерологичных микроорганизмов в концентрации 100 млн м.к./мл (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1

Вид (серогруппа) микроорганизма	Количество исследованных штаммов	Определяемая концентрация, м.к./мл	Количество выявляемых штаммов
<i>L. pneumophila</i> (1)	5	$1 \cdot 10^5$	5
<i>L. pneumophila</i> (2)	1	$1 \cdot 10^8$	-
<i>L. pneumophila</i> (3)	1	То же	-
<i>L. pneumophila</i> (5)	1	»	-
<i>L. pneumophila</i> (6)	1	»	-
<i>L. micdadei</i>	1	»	-
<i>L. bozemanii</i>	1	»	-
<i>L. dumoffii</i>	1	»	-
<i>Y. pestis</i>	3	»	-
<i>B. anthracis</i>	1	»	-
<i>F. tularensis</i>	3	»	-
<i>B. abortus</i>	2	»	-
<i>B. mallei</i>	1	»	-
<i>B. pseudomallei</i>	1	»	-
<i>V. cholerae</i>	1	»	-
<i>E. coli</i>	1	»	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	6	»	-
<i>Y. enterocolitica</i>	3	»	-

Таким образом, получены 3 гибридные клеточные линии МКАт к специфическим эпитопам липополисахаридного антигена *L. pneumophila* серогруппы 1, сохраняющих высокую стабильность основных свойств при культивировании *in vivo*. Разработана методика получения высокоактивной и специфичной гипериммунной кроличьей сыворотки против липополисахаридного антигена *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*. Приготовлены препараты специфических легионеллезных моно- и поликлональных антител, и на их основе разработана высокочувствительная и специфичная иммуоферментная тест-система, перспективная для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
2. *Прозоровский С.В., Покровский В.И., Тартаковский И.С.* Болезнь легионеров (легионеллез). М.: Медицина; 1984. 207 с.
3. *Тартаковский И.С.* Болезнь легионеров. Легионеллез – прошлое, настоящее, будущее. Медицина для всех. 2000; 2:23–5.
4. *Темежникова Н.Д., Тартаковский И.С.* Легионеллезная инфекция. М.: Медицина; 2007. 264 с.
5. *Фримель Г.* Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
6. *Galfre G., Howe S.C., Milstein C., Butcher G.W., Howard J.C.* Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hy-

brid cell lines. *Nature*. 1977; 266(5602):550–2.

7. *Johnson W., Pesanti E., Elliott J.A.* Serospecificity and opsonic activity of antisera to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 1979; 26:698–704.

8. *Nacane P.K., Kawaoi A.* Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 472 p.
2. *Prozorovsky S.V., Pokrovsky V.I., Tartakovsky I.S.* [Legionnaires Disease (Legionellosis)]. M.: Meditsina; 1984. 207 p.
3. *Tartakovsky I.S.* [Legionnaires Disease. Legionellosis – Past, Present, and Future]. *Meditsina dlya vsekh*. 2000; 2:23–5.
4. *Temzhenikova N.D., Tartakovsky I.S.* [Legionellosis Infection]. M.: Meditsina; 2007. 264 p.
5. *Frimel' G.* [Immunologic Methods]. M.: Meditsina; 1987. 472 p.

Authors:

Kuklina G.V., Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kutaev D.A., Yanov D.S., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Vorob'eva T.P., Darmov I.V., Pechenkin D.V. Research Centre of Biosecurity of the “33rd Central Research and Probation Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation”. Kirov, Russia.

Об авторах:

Куклина Г.В., Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Кутаев Д.А., Янов Д.С., Кытманов А.А., Богачева Н.В., Воробьева Т.П., Дармов И.В., Печенкин Д.В. Научно-исследовательский центр биологической защиты «33 Центрального научно-исследовательского испытательного института Министерства обороны Российской Федерации». Киров.

Поступила 29.04.11.