

условиях животноводческих хозяйств или в походно-полевых условиях. Однако, для его внедрения в лабораторную практику требуется решить ряд проблем. Учет результатов в нашей работе проводился в амплификаторе ДТпрайм, разработанным для постановки и учета результатов ПЦР-РВ, однако изотермический характер реакции LAMP позволяет проводить детекцию в более простых, недорогих и компактных приборах. Компании Eiken Chemical (Япония) и OptiGene Limited (Великобритания) уже разработали и внедрили подобные приборы, основанные на методах турбидиметрии или флуориметрии с детекцией в режиме реального времени. Актуальной остается разработка и внедрение портативного термостатируемого флуориметра отечественного производства для постановки ИАНК. Важной проблемой остается также создание упрощенных систем пробоподготовки, позволяющих быстро и с минимальным риском контаминации подготовить образцы к анализу во внелабораторных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Craw P., Balachandra W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*. 2012, 12(14):2469-2486.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28(12): E63.
3. Notomi T., Mori Y., Tomita N. et al Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. 2015, 53 (1):1-5.
4. Streck A.F., Ruster D., Truyen U. et al. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Meth.* 2013, 193:6-8.
5. Seyrig G., Stedtfeld R., Tourlousse D. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J. Microbiol. Methods*. 2015, 119:223-227.
6. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016, 61(1):20-5.
7. Wang J., Cheng S., Yi L. et al. Detection of mink enteritis virus by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Virol. Meth.* 2013, 187:401-405.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.В.Солдатенкова, Е.М.Зимина, А.М.Кудряшова, Н.Ф.Гаврилова, И.В.Яковлева, О.В.Борисова, В.В.Свиридов, Н.А.Михайлова

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

Цель. Разработка и оптимизация иммуноферментных методов для контроля качества рекомбинантной вакцины синегнойной. *Материалы и методы.* Рекомбинантные белки в промежуточных продуктах и при контроле полноты сорбции выявляли в «сэндвич» вариантах твердофазного ИФА с использованием специфических поликлональных и моноклональных антител. Определение антигена в вакцине проводили по остаточному количеству антител, специфичных к анатоксину или OpgF, не связавшихся с вакцинным препаратом в процессе предварительной инкубации. *Результаты.* Разработаны и оптимизированы ИФА для количественного определения компонентов (анатоксина и мембранного белка OpgF) рекомбинантной вакцины синегнойной в процессе производства. Установлено, что методики являются специфичными для определения анатоксина и OpgF, предел их количественного определения обладает приемлемой надежностью, показана возможность выбора интерполяции калибровочной зависимости в пределах аналитической области, правильность и прецизионность удовлетворяют критериям приемлемости, методика устойчива в условиях проведения анализа. *Заключение.* Методы могут быть использованы для контроля качества препарата в процессе его изготовления и хранения.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 95–100

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, белок наружной мембраны OpgF, анатоксин, иммуноферментный анализ, рекомбинантная вакцина синегнойная

DEVELOPMENT OF ELISAS FOR THE QUALITY CONTROL OF A RECOMBINANT PSEUDOMONAS VACCINE

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Development and optimization of enzyme immunoassays for quality control of pseudomonas recombinant vaccine. *Materials and methods.* Recombinant proteins in intermediate products and for completeness of adsorption control were detected in sandwich immunoassay using specific polyclonal and monoclonal antibodies. Detection of the antigen in the vaccine was carried out on the residual amount of antibodies specific to toxoid or OprF that did not bind to the vaccine preparation during the preincubation. *Results.* ELISAs have been developed and optimized for the quantitative determination of the components (toxoid and membrane protein OprF) of the Pseudomonas recombinant vaccine during the production process. It has been established that: the methods are specific for the determination of toxoid and OprF, the quantitative limit determination has acceptable reliability, the possibility of choosing interpolation of the calibration dependence within the analytical area is shown, the accuracy and precision meets the acceptance criteria, the technique is stable under the conditions of the analysis. *Conclusion.* Methods can be used to control the quality of the drug during its developing and storage.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 1, P. 95—100

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, OprF outer membrane protein, toxoid, enzyme immunoassay, recombinant pseudomonas vaccine

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых *Pseudomonas aeruginosa*, проводят вакцинацию, антибиотикотерапию и фаготерапию. Однако многочисленные исследования показывают, что широкое бесконтрольное применение антибиотиков привело к серьезному ограничению в вариантах лечения и вскрыло проблему антибиотикорезистентности возбудителя. В связи с этим вакцинопрофилактика приобрела приоритетное значение в борьбе с синегнойной инфекцией.

В НИИВС им. И.И. Мечникова разработана рекомбинантная вакцина, предназначенная для профилактики синегнойной инфекции, проходящая в настоящее время доклинические испытания. Препарат состоит из двух протективных рекомбинантных белков *P. aeruginosa*, сорбированных на гидроксиде алюминия [3,6]. Для доклинических испытаний получены три серии рекомбинантной синегнойной вакцины (РВС). Целью настоящего исследования является разработка иммуноферментных методов для контроля качества препарата, позволяющих выявлять отдельные компоненты до их сорбции на гидроксиде алюминия, так и определять количественный состав готового вакцинного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомбинантные белки OprF [2] (четыре серии) и анатоксин [1] (aTox; четыре серии), 3 серии вакцины РВС [3,6], конъюгаты (КГ) моноклональных антител с пероксидазой хрена, специфичные к OprF (№ 1, 5) и специфичные к анатоксину (№ 21) [Солдатенкова А.В. и др., 2013].

Поликлональные антитела кролика выделяли из иммунных сывороток путем осаждения сульфатом аммония и хроматографической очистки на иммунном сорбенте. Сыворотку крови кроликов получали четырехкратной иммунизацией с двухнедельным интервалом анатоксином в дозе 50 мкг/животное с адьювантом. Забор крови осуществляли через две недели после последнего введения. Конъюгаты антител с пероксидазой хрена готовили по методу Nakane P.K. and Kawoi A.A. [9]. Стандартные серии рекомбинантных белков и вакцинных препаратов получали со-

гласно методикам, разработанным в НИИВС им. И. И. Мечникова [1,2]. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Milli-Q System, Millipore, США). Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты (Costar).

Оптическую плотность измеряли на аппарате BioRadModel 680. Инкубацию планшет проводили на термостатируемом планшетном встряхивателе (ELMI SkyLine) при режиме 500 об/мин и температуре 37 °С. После всех инкубаций проводили отмывку планшет на планшетном промывателе (StatFax).

В «сендвич» варианте ИФА для выявления рекомбинантного анатоксина использовали специфические поликлональные антитела кролика для захвата и моноклональные антитела мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (ПХ), в качестве детектирующих. Выявление ОpgF осуществляли с использованием пары специфичных моноклональных антител.

В 96-луночные планшеты вносили по 100 мкл поликлональных антител к анатоксину или моноклональных антител к ОpgF в 0,02 М фосфатном буферном растворе рН 7,2. Параллельно анализировали разведения стандартной и исследуемой серии рекомбинантного белка. Планшеты выдерживали в течение 19-22 ч при температуре (4-8) °С. Далее вносили образцы, содержащие рекомбинантный анатоксин или ОpgF в различных разведениях в 0,02 М фосфатном буфере рН 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20 и выдерживали при температуре 37±2 °С и постоянном встряхивании со скоростью 500 об/мин в течение 1 ч. На второй стадии анализа, после отмывки, в лунки вносили 100 мкл конъюгата (КГ), соответственно, моноклональных антител к анатоксину или ОpgF, конъюгированных с пероксидазой хрена, и повторяли этап инкубирования в течение 30±2 мин. После отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора рН 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм. Калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации белка строили на основании данных, полученных для стандартных серий соответствующих рекомбинантных белков.

Выявление анатоксина и ОpgF в вакцинных препаратах проводили следующим образом: параллельно анализировали разведения стандартной и исследуемой серии вакцины. На первой стадии в пробирках смешивали конъюгат моноклональных антител с пероксидазой хрена, специфичных к анатоксину или ОpgF, с разными разведениями образцов (от 0,5 до 10 мкг/мл в пересчете на анатоксин или на ОpgF) и выдерживали пробы при температуре 22±4 °С в течение 40 мин, периодически перемешивая. Образовавшийся комплекс антител, меченных пероксидазой, с антигеном (АГ), сорбированным на геле гидроксида алюминия, отделяли центрифугированием. Не связавшиеся антитела, меченные ПХ, оставшиеся в надосадочной жидкости, исследовали методом иммуноферментного анализа.

Для постановки ИФА использовали полистироловые планшеты, сенсibilизированные аTox или ОpgF. В лунки планшета вносили по 100 мкл надосадочной жидкости и инкубировали в течение 30 мин в шейкере при температуре 37±2 °С, скорости вращения 500 об/мин. Ферментативную реакцию регистрировали, как описано выше.

Строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного анатоксина или ОpgF в стандартной серии. Регистрируемая оптическая плотность была обратно пропорциональна концентрации аTox или ОpgF в анализируемых образцах.

В каждом случае проводили подбор параметров ИФА с целью достижения максимальной чувствительности. Чувствительность оценивали путем определения предела обнаружения (ПО) и предела количественного обнаружения (ПКО). ПО определяли по калибровочному графику как концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности (ОП порог.), определяемому по формуле: $ОП_{порог.} = ОП_{ср.К.} - \pm 3\sigma$, ПКО определили по калибровочному графику как концентрацию препарата, соответствующую пороговому значению оптической плотности, определяемому по формуле: $ОП_{порог.} = ОП_{ср.К.} \pm 10\sigma$, где $ОП_{ср.К.}$ —

среднее арифметическое значение ОП нулевой пробы, σ — среднее квадратическое отклонение ОП нулевой пробы (8 повторов).

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественной оценки рекомбинантных антигенов до сорбции на геле гидроксида алюминия оптимизированы твердофазные иммуоферментные двухстадийные сэндвич-методы.

На основании результатов исследований токсичности, иммуногенности и продолжительности по одной серии рекомбинантных белков OgrF и aTox и вакцины были определены как стандартные. Проведена оптимизация всех стадий иммуоферментного анализа: подобраны пары иммобилизованных и детектирующих антител, их концентрации, время и режим инкубаций, концентрации конъюгатов. Для выявления анатоксина оптимальной парой антител оказались поликлональные антитела кролика в качестве иммобилизованных в концентрации 5 мкг/мл и КГ моноклональных антител № 21 с пероксидазой хрена в разведении 1:80 000. В методе для выявления OgrF оптимальная концентрация иммобилизованных антител (МкАт № 5) соответствовала 2 мкг/мл КББ, в качестве детектирующих антител использовали МкАт № 1, меченные ПХ в концентрации 1:80 000. Содержание анатоксина или OgrF в исследуемых образцах определяли по калибровочному графику зависимости оптической плотности от количественного содержания aTox или OgrF в разведениях стандартных серий с известным содержанием белков. Типичные калибровочные графики представлены на рис. 1 (А,Б).

Проведена оценка валидационных параметров методик для количественного определения анатоксина и OgrF по следующим параметрам: специфичность методики, предел количественного определения, правильность, точность, сходимость, воспроизводимость и устойчивость методики [4,5,8].

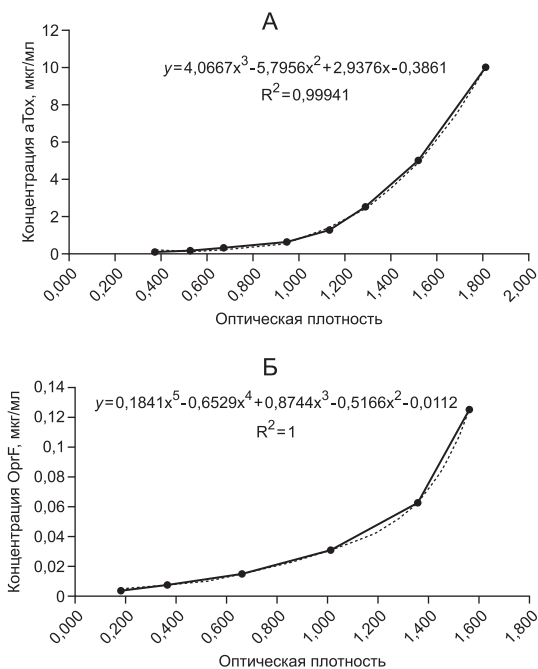


Рис. 1. Калибровочные графики зависимости оптической плотности от концентрации aTox (А) и OgrF (Б) (мкг/мл).

Разработанные методы были специфичны для выявления анатоксина и OgrF, соответственно, присутствие второго компонента вакцины не влияло на предел количественного обнаружения. ПКО обеспечивает необходимую чувствительность для определения aTox и OgrF до сорбции и при определении остаточных белков после сорбции на гидроксида алюминия и составляет менее 0,1% от содержания рекомбинантных белков в вакцинном препарате. Тест на линейность при разведении соответствовал валидационным критериям, показал отклонение не более чем на 20 %.

Оптимизация методик оценки количественного содержания рекомбинантных белков в составе вакцины выполнена с использованием стандартной серии вакцины с содержанием aTox 100 мкг/мл и OgrF 50 мкг/мл. Оптимальная концентрация анатоксина или OgrF, иммобилизованных на поверхности лунок планшета, составила 2 мкг/мл в КББ для обоих рекомбинантных белков, рабочие разведения конъюгатов МкАт-ПХ соответствовали 1:80 000. Калибровочные

графики и аналитические характеристики методов для количественной оценки рекомбинантных белков в вакцине представлены на рис. 2 и в табл. Предел количественного обнаружения составил не более 1,5% от номинального содержания антигена в вакцине.

Контроль качества сорбированной вакцины предполагает количественное определение содержания компонентов в промежуточных и конечном продуктах. Одним из подходов количественного определения антигена в адсорбированном препарате является десорбция компонентов с частиц гидроксида алюминия [10].

В настоящем исследовании использован альтернативный подход, предполагающий определение антигена в исследуемой вакцине по остаточному количеству антител, специфичных к анатоксину или OrgF, не связавшихся с вакцинным препаратом в процессе предварительной инкубации.

В отличие от описанных аналогичных подходов [7], [EP 2 705 365 B1. Immunoassay for direct determination of antigen content of products comprising adjuvant-coupled-antigen particles; US 2004/0033545 A1. Competitive enzyme immunoassay for assessing total antigen content of aluminum-adsorbed antigens] для инкубации с вакцинными препаратами использовали специфические моноклональные антитела, конъюгированные с пероксидазой, что позволяло проводить их выявление прямым твердофазным иммуоферментным методом только в одну стадию. Методика, разработанная для количественного определения адсорбированного на гидроксида алюминия антигена, включала стадию центрифугирования, что сводило к минимуму влияние гидроксида алюминия на результаты иммуоферментного анализа.

В результате проведенной валидации установлено, что методики являются специфичными для определения анатоксина и OrgF, предел их количественного определения обладает приемлемой надежностью, показана возможность выбора интерполяции калибровочной зависимости в пределах аналитической области, правильность и прецизионность удовлетворяют критериям приемлемости, методика устойчива в условиях проведения анализа.

Таким образом, разработаны и оптимизированы варианты ИФА для количественного определения компонентов (анатоксина и мембранного белка OrgF) рекомбинантной вакцины синегнойной в процессе производства. Методы могут быть использованы для контроля качества препарата в процессе его изготовления и хранения.

Работа выполнена в рамках Государственного Контракта от 28 апреля 2017 г. № 14. N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

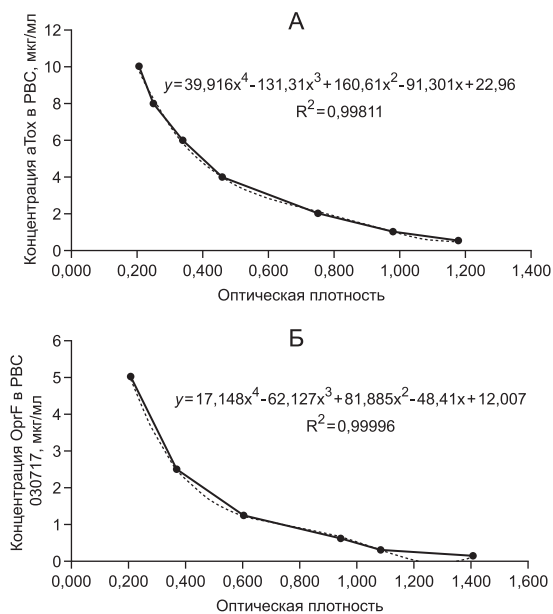


Рис. 2. Калибровочные графики с обратной зависимостью для количественного определения аТох (А) и ОргF (Б) в вакцине (мкг/мл).

Результаты определения аТох и ОргF в двух сериях вакцины РВС-2 и РВС-3

Серия вакцины	РВС-2	РВС-3
Номинальное значение аТох, мкг/мл	100	100
Расчитанное значение аТох, мкг/мл	104,9±2,4	101,1±2,9
КВ %, анатоксин	8,0	5,0
Номинальное значение ОргF, мкг/мл	50	50
Среднее значение ОргF, мкг/мл	50,03±2,6	45,4±3,2
КВ%, ОргF	5,0	7,2

ЛИТЕРАТУРА

1. Калошин А.А., Гатыпова Е.В., Михайлова Н.А. Получение рекомбинантных форм белка F наружной мембраны *Pseudomonas aeruginosa* и исследование их иммуногенных свойств. Биотехнология. 2011, 2:74-84.
2. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертиев Ю.В. Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012, 154 (9): 330-335.
3. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник РАМН. 2016, 71 (1): 5-10.
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.
5. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов эксперимента.
6. Солдатенкова А.В., Калошин А.А., Поддубиков А.В., Зимина Е.М., Калиниченко Е.О., Михайлова Н.А. Протективные свойства и безопасность рекомбинантной синегнойной вакцины. Цитокины и воспаление. 2017, 16 (4): 73-75.
7. Cuervo M.L., Sterling A.L., Nicot I.A. et al. Validation of a new alternative for determining in vitro potency in vaccines containing Hepatitis B from two different manufacturers. Biologicals. 2008, 36: 375-382.
8. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). 2011.
9. Nakane P.K., Kawoi A.A. New method of conjugation. Histochem. Cytochem. 1974, 22:1084-1091.
10. Shanmugham R., Thirumeni N., Rao V.S. et al. Immunocapture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Assessment of In Vitro Potency of Recombinant Hepatitis B Vaccine. Clinical and Vaccine Immunology. 2010, 17 (8): 1252-1260.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.Б.Филина^{1,3}, О.А.Свитич^{1,3,4}, Ю.И.Аммур¹, А.К.Голенков², Е.Ф.Клинушкина², В.В.Зверев^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ CXCL12, CCR4, EGFR В МИГРИРУЮЩИХ КЛЕТКАХ МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ДО И ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ

¹НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, ²Московский областной клинический НИИ им.М.Ф.Владимирского, ³Первый московский государственный медицинский университет им.И.М.Сеченова, ⁴Российский национальный научно-исследовательский медицинский университет им.Н.И.Пирогова, Москва

Цель. Изучение влияния CXCL12 на миграцию мононуклеарных клеток, выделенных от здоровых пациентов, пациентов с миеломонобластным лейкозом до и после химиотерапии, а также исследование экспрессии генов CCR4, EGFR, CXCL12 после воздействия CXCL12. *Материалы и методы.* Исследовался хемотаксис мононуклеарных клеток (МНК) здоровых доноров и пациентов с миеломонобластным лейкозом в камере Бойдена с последующим выделением РНК, проведение обратной транскрипции и ПЦР-РВ. *Результаты.* Выявлено достоверное усиление хемотаксиса по направлению к CXCL12 клеток МНК миеломонобластного лейкоза после проведенной химиотерапии, а также снижение экспрессии данного хемокина в опухолевых клетках до химиотерапии после воздействия на него CXCL12. *Заключение.* Предположительно опухолевые клетки сами продуцируют CXCL12 в большом количестве, что необходимо для нарушения межклеточных взаимодействий и дальнейшей интравасии, продукция которого может снижаться при внешней стимуляции этим же хемокином. CXCL12 также способствует повышению уровня экспрессии EGFR и CCR4, что приводит к усилению пролиферации опухоли и миграции опухолевых клеток.

Журн. микробиол., 2019, № 1, С. 100—104

Ключевые слова: хемотаксис, CXCL12, лейкоз, хемокины, камера Бойдена