

Материалы VII Национального конгресса бактериологов (дополнение)*

г. Санкт-Петербург, 28–30 сентября 2022 г.

Прототип модульной вакцины на основе бактериальных теней *Yersinia pestis*

Анисимов А.П., Вагайская А.С., Жумакаев Р.Х., Дентовская С.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация

Одно из направлений реализации федерального проекта «Санитарный щит – безопасность для здоровья» – разработка в короткие сроки (до 4 мес.) вакцин против новых инфекций, в то время как суммарно на разработку одной бактериальной вакцины (базовые исследования, доклинические испытания, 1–3-я фазы клинического этапа) обычно уходит 10–15 лет. В отношении же вирусных инфекций допускается экстренный выпуск вакцин, что не означает полного отказа от их проверки – вакцина проходит установленные протоколом этапы, но в сокращенном варианте. Быстрота разработки противовирусных препаратов объясняется и тем, что размер генома вируса меньше генома бактерии примерно в 2000 раз, что снижает объем и сроки этапа базовых исследований новых вирусных патогенов. Вирусы очень изменчивы и постоянно маскируются от иммунной системы хозяина с помощью аминокислотных замен в одном-двух поверхностных белках. У вируса гриппа А это гемагглютинин и нейраминидаза. Хорошая изученность молекулярной биологии этого вируса позволяет предсказывать вероятные мутации и заранее создавать актуальную вакцину. У бактерий количество переменных (поверхностных антигенов), которые взаимодействуют с иммунной системой, на порядок больше. И, соответственно, предсказание антигенного состава грядущих «пандемических» штаммов маловероятно.

Как же уложиться в срок 4 мес.? Решить эту проблему может технология модульных вакцин, опирающаяся на предварительно созданный конструктор, включающий базовые носители на основе уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие заранее приготовленных конструкторов, чьи базовые носители и модульные антигены успешно прош-

ли фазу II клинических испытаний, может ускорить разработку вакцин, но требует предварительных исследований.

В качестве базового носителя выбрали бактериальные тени бесплазмидного штамма *Yersinia pestis* основного подвиды, эффективно защищающие от гибели зараженных чумой морских свинок, а в качестве модульных антигенов – протективные для мышей изоформы белков Caf1 и LcrV. Как и в предварительных исследованиях, иммунная система мышей практически не отвечала на введение бактериальных теней, а у морских свинок, наоборот, формировался напряженный иммунитет. Модульные же антигены Caf1 и LcrV, обеспечивающие 100%-ю защиту мышей, были протективны лишь в отношении $\leq 70\%$ морских свинок. Двукратное введение прототипа модульной чумной вакцины, включающего как базовый носитель, так и модульные антигены, эффективно защищало оба вида лабораторных животных, причем компоненты, входящие в его состав, взаимно потенцировали протективные свойства друг друга.

Работа выполнена по НИОКР 3.3 в рамках государственного задания.

Рациональная стратегия разработки противобруцеллезных вакцин

Дятлова В.И.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация

Бруцеллез – одно из наиболее распространенных зоонозных заболеваний, передающихся человеку от инфицированных животных, наносящее как экономический, так и социальный ущерб. Необходимость совершенствования специфической профилактики данной инфекции обусловлена напряженной эпидемиологической ситуацией, вызванной наличием на территории России активных очагов бруцеллеза сельскохозяйственных животных, возможностью завоза инфекции из-за рубежа, а также реальной угрозой биотерроризма – причинами, способными вызывать эпидемические проявления чрезвычайного характера.

*Материалы VII Национального конгресса бактериологов опубликованы в журнале «Бактериология» 2022; 7(3): 11–82.

В настоящее время в Российской Федерации применяется живая противобруцеллезная вакцина, разработанная в середине прошлого века, характеризующаяся значительной реактогенностью и недостаточной эффективностью при проведении ревакцинаций. Современные тенденции в разработке вакцин против бруцеллеза, обусловленные стремительным развитием геной инженерии и биоинформатики, включают создание живых генно-модифицированных и векторных вакцин, а также бесклеточных субъединичных и ДНК-вакцин на основе иммунодоминантных антигенов бруцелл. С помощью методов обратной вакцинологии можно уже на начальном этапе создания вакцин выбрать наиболее иммуногенные белки, способные обеспечить долговременный и напряженный противобруцеллезный иммунитет.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении антигенов *Brucella abortus*, наиболее перспективных для включения в состав субъединичных вакцин. Для этого с использованием 24 компьютерных программ и нескольких баз данных провели биоинформатический анализ 45 предсказанных поверхностных белков *B. abortus*. В результате анализа выявили 8 белков: WP_002966739.1 (LptD), WP_002964462.1 (BhuA), WP_002965367.1 (Omp25d), WP_002965368.1 (Omp25c), WP_002967184.1 (FigH), WP_002966644.1 (FigE), WP_002969598.1 (AlgEfp) и WP_002963597.1 (MliCfp), наиболее перспективных для включения в состав вакцинного препарата. Адьювантная активность показана для рекомбинантных белков Omp16, Omp19, BLS, BCSP31 и липополисахарида *B. abortus*. Также во многих исследованиях продемонстрирована адьювантная способность флагеллинов, стимулирующих врожденный иммунитет через активацию TLR5.

Таким образом, включение в состав мультиантигенных вакцин ранее изученных белков, в том числе обладающих адьювантными свойствами, а также «новых», выявленных с помощью методов биоинформатики, антигенов может стать ключом к созданию эффективной вакцины против бруцеллеза. Несмотря на логичность и обоснованность подхода обратной вакцинологии, только экспериментальные данные можно рассматривать как надежный источник информации об эффективности вакцинного препарата.

Работа выполнена по НИОКР 3.1.2 в рамках государственного задания.

Оценка разнообразия штаммов ботулинических клостридий, выделенных в 2018–2022 годах

Зенинская Н.А., Мицевич И.П., Комбарова Т.И., Карцев Н.Н., Детушев К.В., Фирстова В.В., Храмов М.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Ввиду повсеместного распространения патогенных клостридий постоянный санитарный контроль и своевременное определение вызываемых ими токсикоинфекций являются важной задачей для клиницистов и эпидемиологов. Несмотря на сравнительную редкость подобного рода заболеваний, тяжесть протекания пищевого ботулизма и последующих

осложнений мотивирует к всестороннему анализу рисков и разработке более современных средств терапии.

Целью данной работы является идентификация и оценка токсикологических свойств ботулинических клостридий, полученных из проб клинического материала и пищевых продуктов в период с 2018 по 2022 г.

Материалы и методы. Выделение культур из образцов осуществлялось на дифференциальных питательных средах, культивирование в анаэробных условиях проводилось с использованием анаэроостатов. Видовая идентификация морфологически сходных штаммов производилась методом времяпролетной масспектрометрии с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Генотипирование осуществлялось методом 16S rRNA секвенирования. Все полученные штаммы депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ Оболенск».

Токсикологический анализ выделенных штаммов был проведен методом биопробы на мышах. При наличии гибели животных производили титровку культуральной жидкости для повторной проверки на мышах с целью определения приблизительных концентраций наработанного токсина.

Результаты. В ходе данных исследований удалось выделить 25 штаммов рода *Clostridium*, 48% из которых оказались представителями вида *C. botulinum*. Среди выявленных ботулинических клостридий 33,3% синтезировали ботулотоксин типа А, 16,6% – типа В и 25% – типа Е. Помимо этого, 25% штаммов были способны вырабатывать нейротоксины двух типов.

Токсическая активность штаммов варьировала в широких пределах: от инициации болезненных состояний у лабораторных животных и отсутствия летальности до выработки значительных количеств токсина (ориентировочно 200 000 мышинных внутриперитонеальных доз LD₅₀ в 1 мл суточного культурального бульона). При этом наиболее интенсивными продуцентами оказались штаммы, синтезирующие 2 типа токсина.

Выводы. В результате данной работы нам удалось выявить широкое разнообразие штаммов *C. botulinum*, представляющих серьезные риски для населения.

Работа выполнена по НИОКР 3.1. в рамках государственного задания.

Реконструкция полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Yersinia pestis*

Кисличкина А.А., Сизова А.А., Скрябин Ю.П., Платонов М.Е., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Yersinia pestis – возбудитель природно-очаговой особо опасной инфекционной болезни, сопровождающейся высокой летальностью и вероятностью эпидемического распро-

странения. Природные очаги чумы существуют на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды. На территории СНГ расположено 43 очага чумы. Основными носителями в природных очагах чумы являются дикие грызуны – сурки, суслики, песчанки, полевки и многие другие, а передачу чумы обеспечивают как минимум 80 видов блох. Широкий круг хозяев и переносчиков в сочетании с географической разобщенностью отдельных природных очагов чумы с различными экологическими условиями способствуют селекции генетических вариантов, специфичных для определенных природных очагов. Анализ геномов штаммов *Y. pestis* способствует накоплению знаний о происхождении, филогении и генетическом разнообразии возбудителя чумы. Реконструкция полного генома, в котором установлены порядок и ориентация всех участков нуклеотидной последовательности, позволяет сравнивать структуру всего генома, выявлять инверсии и определять точное количество повторяющихся элементов.

Целью работы являлась реконструкция полных последовательностей бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Y. pestis*, относящихся к геногруппе 2.MED1, но выделенных в разных очагах, и оценка их различий.

В исследование были включены 2 штамма *Y. pestis* – штамм C-690 (выделен в очаге 43) и штамм C-332 (очаг 01). Для реконструкции полных геномов штаммов *Y. pestis* ДНК секвенировали на платформах Illumina MiSeq и Nanopore MinION. Гибридную сборку полной последовательности геномов проводили с помощью программы Unicycler v0.4.7 с настройками по умолчанию. Финальные сборки геномов штаммов содержали по четыре кольцевых контига. С помощью сервиса BLAST (nucleotide search) идентифицированы хромосомы и плазмиды. Геном штамма *Y. pestis* C-690 состоит из хромосомы (4 619 998 п.н.) и плазмид: pMT (100 989 п.н.), pCD (70 509 п.н.) и pPCP (9 610 п.н.). Геном штамма *Y. pestis* C-332 состоит из хромосомы (4 503 017 п.н.) и плазмид: pMT (100 989 п.н.), pCD (70 509 п.н.) и pPCP (9 610 п.н.). Для детального сравнения хромосом использовали программу Snippy. В результате было выявлено 39 SNP, 3 комплексных SNP, 24 делеции и 24 инсерции. При сравнении хромосом в программе Mauve выявлены три участка инверсий, а также в хромосоме штамма *Y. pestis* C-332 отсутствует *rgm*-локус. Плазмиды имеют одинаковый размер, pPCP идентичны, а pMT и pCD штамма *Y. pestis* C-690 отличаются от гомологичных плазмид штамма *Y. pestis* C-332 на одну SNP.

В результате проведенной работы получены полные последовательности бактериальных хромосом и плазмид штаммов *Y. pestis*. Анализ геномов позволил выявить различия между штаммами, относящихся к геногруппе 2.MED1, но выделенных в разных природных очагах.

Работа выполнена по НИОКР 1.1.18 в рамках государственного задания.

Оценка эффективности изотермических амплификационных технологий для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа

Леденева М.Л.¹, Буй Т.Л.А.², Ткаченко Г.А.¹,
Бартенева М.В.¹, Захарова И.Б.¹

¹ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация;

²Российско-Вьетнамский Тропический научно-исследовательский и технологический центр, Ханой, Вьетнам

Методы изотермической амплификации ДНК/РНК активно рассматриваются в молекулярной диагностике инфекционных заболеваний как альтернатива полимеразной цепной реакции (ПЦР), в связи с чем оценены критерии диагностической ценности методов выявления возбудителя мелиоидоза, основанных на изотермических технологиях – петлевой изотермической амплификации (LAMP) и реакции транскрипционной амплификации в режиме реального времени (RT-NASBA).

Оценка аналитических характеристик LAMP показала 100%-ю специфичность при аналитической чувствительности 68,8 фг в реакционной смеси, что соответствует 1×10^3 м.к./мл. Для оценки эффективности LAMP для выявления *Burkholderia pseudomallei* в сравнении с ПЦР при тестировании одной и той же генной мишени (*orf2* кластера T3SS1) исследовали тотальную ДНК, выделенную непосредственно из проб почвы, отобранных во Вьетнаме. Образцы для тестирования были выбраны на основании результатов бактериологического исследования и ПЦР на зарегистрированном наборе реагентов (PV P3H 2018/7785) с секвенированием полученных фрагментов. Исследованы 21 положительная и 4 отрицательных пробы. Предсказательная ценность положительного результата LAMP и ПЦР составили 86 и 100%, отрицательного результата – 25 и 57%; диагностическая эффективность – 76 и 88%. Невысокие диагностические показатели LAMP, по видимому, обусловлены высоким GC-составом видоспецифической для *B. pseudomallei* мишени.

Аналитическая чувствительность экспериментальной тест-системы «АмплигенBurk23S pPHK-PB» для выявления возбудителей мелиоидоза и сапа в RTNASBA составила 2 фг в реакционной смеси, что соответствует 0,4 фг/мкл тотальной РНК в образце (1×10^1 м.к./мл), при 100%-й специфичности. Диагностические показатели оценивали на пробах биоматериала от сирийских хомяков с острым экспериментальным мелиоидозом и сапом (по 20 проб от 4 инфицированных и по 5 проб от контрольных животных на каждую инфекцию). Для сравнения использовали группоспецифическую ПРЦ в реальном времени (ПЦР-РВ) (PV P3H 2013/1227). Необходимо отметить, что в ПЦР-РВ все 4 пробы крови от сапных животных были отрицательными, при этом в RT-NASBA была 1 положительная. При экспериментальном мелиоидозе в ПЦР-РВ была одна положительная проба крови, а в RT-NASBA – 4. Это свидетельствует, что уровень бактериальной нагрузки в крови при мелиоидозе или сапе часто

не достигает предела чувствительности метода ПЦР-РВ, что согласуется с данными других исследователей. Предсказательные ценности положительного результата у RT-NASBA и ПЦР-РВ составили по 100% для обеих инфекций, отрицательного результата – 83 и 56% для мелиоидоза, 50 и 38% для сапа; диагностическая эффективность – 96 и 84% для мелиоидоза, 80 и 68% для сапа.

Таким образом, применение LAMP для выявления возбудителя мелиоидоза по чувствительности сопоставимо с ПЦР-РВ, но значительно уступает последнему по диагностической эффективности, в то время как RT-NASBA превосходит ПЦР-РВ как по аналитическим, так и по диагностическим характеристикам и может быть рекомендована для исследования проб с заведомо невысокой бактериальной нагрузкой, а также для верификации дискордантных результатов других методов исследования.

Корреляционный анализ резистентности к антибиотикам и дезинфицирующим средствам у штаммов патогенных буркхольдерий, устойчивых к бензалкония хлориду

Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Burkholderia pseudomallei и *Burkholderia mallei* – микроорганизмы, относящиеся ко II группе патогенности и способные вызывать у человека тяжелые инфекционные заболевания (melioidosis и sap соответственно). Известно, что данные микроорганизмы могут проявлять множественную лекарственную устойчивость. Для отдельных филогенетически близкородственных *B. pseudomallei* и *B. mallei* видов показано наличие резистентности к различным дезинфицирующим агентам и определена положительная корреляционная зависимость между наличием устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам.

Цель работы заключалась в изучении причинно-следственной связи между устойчивостью к дезинфектантам и антибиотикорезистентностью штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выращиваемых на питательной среде с добавлением бензалкония хлорида.

Штаммы патогенных буркхольдерий культивировали на питательных средах с добавлением бензалкония хлорида в повышающихся концентрациях. У исходных штаммов и полученных вариантов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, устойчивых к бензалконию хлорида, определяли устойчивость к амоксициллину, цефтазидиму, доксициклину, меропенему и триметоприму диско-диффузионным методом. Корреляционный анализ между резистентностью к антибиотикам и дезинфицирующим средствам проводили с применением коэффициента корреляции Пирсона.

В результате работы были получены штаммы, характеризующиеся повышенной резистентностью к бензалкония хлориду. Данный признак сохранялся при их культивирова-

нии в течение 15 нед. в отсутствии ингибирующего агента. Анализ чувствительности к антибактериальным препаратам у штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, устойчивых к дезсредству, выявил наличие высокой корреляционной связи между снижением чувствительности к бензалкония хлориду и повышением резистентности к амоксиклаву и цефтазидиму. Статистическая обработка данных показала значимую корреляцию между этими признаками. Так, была выявлена прямая корреляционная зависимость высокой силы для амоксициллина ($r = 0,7$) и цефтазидима ($r = 0,8$). При этом какие-либо причинно-следственные связи между повышением устойчивости к дезинфектанту и резистентностью к доксициклину ($r = 0,0$), меропенему ($r = 0,1$) и триметоприму ($r = -0,1$) отсутствовали.

Таким образом, штаммы патогенных буркхольдерий при формировании устойчивости к бензалкония хлориду приобретают резистентность к амоксициллину и цефтазидиму.

Особенности выделения вируса Западного Нила из проб клинического материала и объектов окружающей среды для сохранения исходных патогенных свойств изолята

Мачнева А.Ю., Герасимова А.Д., Гусев Е.А., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (ВЗН) относится к роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита семейства *Flaviviridae* и является возбудителем лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Для изоляции вируса из клинического материала, а также из объектов окружающей среды и дальнейшего его изучения необходимо подобрать модель, которая способна не только обеспечить эффективную репродукцию вируса, но и сохранить исходные свойства изолята.

Для выделения ВЗН могут быть использованы новорожденные мыши, клеточные линии млекопитающих Vero, ВНК-21 и насекомых С6/36, куриные эмбрионы. Особенности строения и биохимические свойства биологических моделей способствуют отбору варианта, максимально адаптированного к инфицированию клеток и репликации в конкретных условиях.

С целью уточнения характера влияния биологической модели, используемой для выделения ВЗН, на патогенные свойства получаемого изолята в течение 2018–2021 гг. пробы, в которых была обнаружена РНК ВЗН, пассировали одновременно на различных моделях: мышах-сосунках, клеточных линиях Vero и С6/36, перепелиных эмбрионах.

Патогенные свойства полученных вариантов изолятов ВЗН изучали с помощью заражения аутобредных белых мышей (модель млекопитающих) и чижей (модель птиц, чувствительных к инфекции ВЗН).

В результате было установлено, что с использованием мышей-сосунков селекционировались наиболее вирулент-

ные варианты ($LD_{50} 3,8 \times 10^3 \pm 0,005 \times 10^4$ БОЕ, $p \leq 0,05$), при заражении которыми быстро (на 3–4-е сутки) развивалась нейротропная форма ЛЗН (в 67%). Схожими свойствами, за исключением нейротропности, характеризовались изоляты, полученные с помощью клеточной линии Vero (гриппоподобная форма заболевания у мышей и птиц в 42% случаях на 4-е сутки). Изоляты ВЗН, выделенные с использованием перепелиных эмбрионов, проявляли выраженные патогенные свойства в отношении чужих, вызывая токсико-септическую форму заболевания и 100%-ю летальность на 5-й день ($LD_{50} 5 \times 10^2 \pm 0,005 \times 10^3$ БОЕ, $p \leq 0,05$). У мышей в те же сроки развивалась гриппоподобная форма ЛЗН в 44% случаев. В случае применения в качестве модели для изоляции ВЗН клеточной линии С6/36 образовывались варианты, обладающие наименьшей вирулентностью ($LD_{50} 7,6 \times 10^5 \pm 0,005 \times 10^4$ БОЕ, $p \leq 0,05$), вызывающие гриппоподобную форму заболевания в 34% случаев и в более поздние сроки (на 7–9-е сутки).

Таким образом, выбор модели для восстановления ВЗН с сохранением исходных патогенных свойств зависит от вида нативного материала (кровь людей, кровососущие комары, головной мозг птиц и т.д.). Так, для выделения ВЗН из проб от людей с нейроинвазивной формой ЛЗН необходимо использовать мышей-сосунков, из проб от больных людей без неврологических проявлений, а также из образцов органов мелких млекопитающих – культуру клеток Vero, из проб пулов кровососущих членистоногих – культуру клеток С6/36, из образцов органов птиц – перепелиные эмбрионы.

Получение моноклональных антител к вирусу Западного Нила и их иммунохимическая характеристика

Пименова Е.В., Елхова А.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (ВЗН) является представителем рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* и принадлежит к антигенному комплексу вируса японского энцефалита. Долгое время считалось, что ВЗН не способен вызывать значимые вспышки заболевания у человека и распространен только в Африке. На сегодняшний день ареал ВЗН охватывает территории Африки, Европы, Азии. В Российской Федерации случаи заболевания лихорадкой Западного Нила (ЛЗН) документально подтверждены на территории более 20 субъектов федерации, а циркуляция возбудителя по результатам мониторинговых исследований объектов внешней среды и серологического обследования здорового населения – более чем в 70 субъектах федерации.

Основными методами выявления маркеров возбудителя являются иммунологические и молекулярно-генетические. С помощью иммунологических методов в полевом и клиническом материале обнаруживаются как антигены, так и антитела. Однако к экспресс-методам анализа относят метод флуоресцирующих антител и реакцию непрямой гемагглютинации. В связи с этим возникает потребность в разработке

и совершенствовании высокоэффективных диагностических средств на основе моноклональных антител (МКА) с целью контроля распространения патогена на новые территории, а также в связи с необходимостью обеспечения импортозамещения на российском рынке.

Цель работы: получить МКА к ВЗН и охарактеризовать их иммунохимическими методами.

Для получения гибридом-продуцентов МКА линейных мышей Balb/c циклично иммунизировали цельновирионным антигеном ВЗН CH1EN-1 с последующей гибридизацией В-лимфоцитов с клетками мышиной миеломы Sp2/0. В результате слияния были отобраны три клона (С8, С2, Н7), стабильно продуцирующих антитела. Свойства МКА к ВЗН, полученных из асцитической жидкости инбредных мышей и выделенных осаждением сульфатом аммония, оценивали в реакции иммунопреципитации и с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Изотипирование МКА проводили в соответствии с инструкцией по применению к набору реагентов Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, США). В качестве положительного контрольного образца использовали инактивированный антиген ВЗН из набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса М к вирусу Западного Нила в сыворотке (плазме) крови «ВектоНил-IgM» (АО «Вектор-Бест»).

Результаты изотипирования, полученные на двух типах антигенов, показали, что все три МКА принадлежали к классу М. Было установлено, что клеточные линии С8 и С2 продуцировали антитела, которые специфически взаимодействовали с антигенами ВЗН как в реакции преципитации, так и в ИФА. Специфическую активность субклонов линий С8 и С2, выявленную с помощью цельновирионного антигена ВЗН CH1EN-1, адсорбированного на твердой фазе, регистрировали в разведении исследуемых образцов 1:104 и 1:103 соответственно. При использовании инактивированного антигена ВЗН титры антител были незначительно ниже и составили 1:103 и 1:102. В то же время МКА линии Н7 не проявляли специфической активности в отношении положительного контрольного образца ни в реакции преципитации, ни в ИФА.

Таким образом, полученные МКА к ВЗН гибридом-продуцентов линий С8 и С2 могут быть использованы для изготовления на их основе иммунодиагностических препаратов.

Обеспечение успешной идентификации белковых токсинов с использованием методов масс-спектрометрического анализа

Сурин А.К., Евтюхова А.Е., Петухов Н.А., Фирстова В.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

В настоящее время основным методом точного определения вида белковых мишеней в любых биологических матрицах является метод, основанный на применении тандема высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и

масс-спектрометрии высокого разрешения (МС). Этот метод основан на предварительном разделении пептидов, полученных после обработки белка / смеси белков ферментом (протеазой) с помощью ВЭЖХ и дальнейшем анализе сываемых с разделяющей колонки пептидов на масс-спектрометре. Такая методика дает возможность с высокой достоверностью определять, какой белковой последовательности соответствует тот или иной пептид.

Современные масс-спектрометрические приборы позволяют работать с пептидами длиной от 6 до 40 аминокислот. Таким образом, качество идентификации белков методом ВЭЖХ-МС зависит от подбора протеазы (фермента, гидролизующего пептидную связь белка). Целью такого подбора является использование такой протеазы, которая будет разрезать целевой белок на пептиды оптимальной длины для анализа на ВЭЖХ-МС. Наибольшую распространенность для этих целей получила протеаза трипсин. Это высокоспецифичная протеаза, которая разрезает белок по пептидной связи между аминокислотами K-X или R-X, где K – лизин, R – аргинин X – любая аминокислота, кроме пролина. Использование трипсина для обработки белков при подготовке к масс-спектрометрическому анализу позволяет качественно идентифицировать как отдельные белки, так и целые протеомы клеток или животных тканей. Однако недостаток использования такого подхода может проявиться в случае работы с малым количеством целевого белка, находящимся в сложной биологической матрице, содержащей большое количество белков кроме искомого целевого белка, причем часто концентрация этих белков на порядки может превышать концентрацию целевого белка.

Первая проблема связана с взаимным расположением лизинов и аргининов в полипептидной цепи. В случае большого процента количества этих аминокислот относительно вклада всех остальных целевой белок может разрезаться преимущественно на малые пептиды, с небольшим количеством средних пептидов, оптимальных для масс-спектрометрического анализа. Или противоположный случай – небольшое содержание лизинов и аргининов, что приведет к получению слишком больших пептидов, сложных для анализа. Таким образом, для контроля конкретного целевого белка необходимо заранее проанализировать его аминокислотную последовательность для принятия решения по использованию оптимальной протеазы для подготовки проб данного белка.

Другая проблема заключается в том, что расчет количества протеазы, необходимой для пробоподготовки, произво-

дится из среднего соотношения белок/протеаза 100:1 или 50:1. При работе с большим белковым фоном относительно целевого белка придется использовать большое количество протеазы, что ведет к большому расходу протеазы и повышению цены анализа. Кроме того, в такой сложной матрице качество гидролиза белка также будет ухудшаться. Большое количество потенциальных мест разрыва пептидных связей будет пропускаться, причем у разных молекул одного и того же белка они будут разные, что приведет к снижению концентраций одинаковых пептидов и увеличению их разнообразия по длине. В ряде случаев эту проблему может решить использование альтернативного метода гидролиза белка без использования ферментов. Такой альтернативой является метод, основанный на использовании цианогенбромида, низкомолекулярного химического вещества. Данный метод эффективен для белков с высоким содержанием метионинов, так как использование этого агента позволяет гидролизовать пептидную связь между метионином и любой другой аминокислотой (кроме пролина). При этом метионин переходит в гомосерин или гомосерин лактон. В зависимости от концентрации белков можно использовать более высокую концентрацию этого агента. Даже при очень высокой концентрации цианогенбромида можно очистить от него полученный препарат пептидов при хроматографии, и он не будет мешать при масс-спектрометрическом анализе.

Для работы с белком ботулотоксина нами была предварительно проанализирована аминокислотная последовательность этого белка. Были рассчитаны теоретически возможные фрагменты этого белка при использовании трипсина. Показано, что в этом случае будут образовываться преимущественно пептиды либо с малой, либо с очень большой длиной. Экспериментально было показано, что использование трипсина дает низкое покрытие экспериментально идентифицированными пептидами аминокислотной последовательности самого ботулотоксина. С другой стороны, в данном белке большое содержание метионинов, а их взаимное расположение дает надежду на получение большого количества пептидов с длиной от 10 до 40 аминокислотных остатков. Мы провели ряд предварительных экспериментов по подбору условий гидролиза ботулотоксина цианогенбромидом. Предварительные эксперименты показали эффективность использования данного агента для гидролиза белка ботулотоксина с целью повышения эффективности его обнаружения.

Работа выполнена по НИОКР 1.1.14 в рамках государственного задания.