

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАТОКСИНА В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

© 2018 г. А. В. Солдатенкова*, О. В. Борисова, А. М. Кудряшова, Н. А. Михайлова

*E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

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

Разработан и оптимизирован метод для количественного определения компонента (анатоксина) сорбированной на гидроксиде алюминия вакцины против синегнойной палочки. Вакцинный препарат выдерживали с конъюгатом специфических моноклональных антител с пероксидазой корня хрена. Образовавшийся комплекс антитела-анатоксин-гидроксид алюминия отделяли центрифугированием, в надосадочных жидкостях методом ИФА определяли несвязавшиеся антитела. Анализ трех серий вакцины данным методом показал, что количество анатоксина варьировало от 91 до 104 мкг/мл и практически не отличалось от концентрации в контрольной серии – 100 мкг/мл.

Ключевые слова: рекомбинантный анатоксин, рекомбинантная вакцина синегнойная, иммуноферментный анализ

DOI: 10.31857/S102872210002662-3

Авторы:

Солдатенкова А. В., к.б.н, с.н.с. лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия;

Борисова О. В., к.х.н., зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия;

Кудряшова А. М., н.с. лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия;

Михайлова Н. А., д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, зав. лабораторией протективных антигенов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия.

Введение. В ФГБНУ НИИВС им И. И. Мечникова разработана вакцина против синегнойной инфекции (РВС), проходящая на данный момент доклинические испытания. В состав вакцинного препарата входят очищенные рекомбинантные белки *P. aeruginosa* – рекомбинантный анатоксин и рекомбинантный пориновый белок OrgF, сорбированные на геле гидроксида алюминия.

Одним из важнейших этапов доклинических испытаний является разработка методов контроля качества вакцины и её компонентов. Количественное определение компонентов вакцины осложнено тем, что белки сорбированы на геле гидроксида алюминия. В связи с этим наиболее приемлемым методом является иммуноферментный анализ (ИФА). Существует

несколько вариантов постановки твердофазного ИФА с сорбированными антигенами: метод, включающий десорбцию антигенов с носителя, и альтернативный – прямой иммуноферментный анализ.

Целью настоящего исследования являлась разработка иммуноферментного метода для количественного определения одного из компонентов вакцинного препарата – рекомбинантного анатоксина (аТох).

Материалы и методы. Разработка ИФА выполнена с использованием рекомбинантного анатоксина (аТох), конъюгатов (Кг) специфических к анатоксину *P. aeruginosa* моноклональных и поликлональных антител, меченных пероксидазой из корня хрена (ПХ) [1, 2].

Схема анализа: на первой стадии в пробирках смешивали конъюгаты моноклональных антител (МкАт) или поликлональных мышинных антител с пероксидазой хрена, специфичных к анатоксину, с разным количеством вакцины (от 0,5 до 10 мкг/мл в пересчёте на анатоксин), и выдерживали пробы при температуре 18–25 °С в течение 40 мин, периодически перемешивая. Образовавшийся комплекс антител, меченных пероксидазой, с Ag, сорбированным на геле гидроксида алюминия, отделяли центрифугированием. Несвязавшиеся с антигеном антитела, меченные ПХ, оставались в надосадочных жид-

костях, которые исследовали методом иммуноферментного анализа. Для постановки ИФА использовали полистироловые планшеты (Costar, кат. № 2593), сенсibilизированные аТох. Анализ выполняли на шейкере при температуре 37 °С, скорости вращения 500 об/мин в течение 30 мин. Ферментативная реакция регистрировалась по изменению окраски субстратно-хромогенной смеси (раствор субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) с добавлением перекиси водорода). Строили калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации рекомбинантного анатоксина, добавленного к конъюгатам МкАт/ПкАт-ПХ. Интенсивность окраски была обратно пропорциональна концентрации аТох в анализируемых образцах.

В работе исследовано три экспериментальные и одна контрольная серии РВС.

Результаты. Разработка методики оценки количественного содержания анатоксина в составе вакцины выполнена с использованием контрольного образца вакцины с известным содержанием аТох – 100 мкг/мл.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что оптимальная концентрация анатоксина, иммобилизованного на поверхности лунок планшета, составляет 2 мкг/мл. Лучшие результаты получены с конъюгатом моноклональных антител. Применение Кг ПкАт-ПХ не обеспечивало четкой разницы между оптической плотностью образцов, содержащих разное количество анатоксина. Рабочее разведение конъюгата МкАт-ПХ равнялось 1:80 000. График зависимости оптической плотности от концентрации антигена строили в полулогарифмических координатах.

На следующем этапе три серии вакцины охарактеризовали с помощью разработанного теста. Кривые зависимости концентрации анатоксина от оптической плотности для анализируемых вакцин были идентичными в сравнении с графиком, полученным для контрольной серии РВС.

Разница в показателях оптических плотностей для разных концентраций аТох не превышала 15%. Рассчитанное количество анатоксина в трех сериях вакцины варьировало от 91 до 104 мкг/мл, то есть практически не отличалось от концентрации аТох в контрольной серии – 100 мкг/мл.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных экспериментов создан иммуноферментный метод количественного определения компонента (анатоксина) вакцины против синегнойной инфекции, который может быть использован для контроля качества препарата в процессе его изготовления.

В настоящий момент проводятся исследования по разработке аналогичного метода контроля второго компонента рекомбинантной вакцины – мембранного белка OprF.

Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом 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».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Калашин А. А., Солдатенкова А. В., Зими́на Е. М., Михайлова Н. А. Разработка экспериментальной рекомбинантной синегнойной вакцины. Ж. актуальная биотехнология № 2 (21) 2017 г., С. 102 [Kaloshin A. A., Soldatenkova A. V., Zimina E. M., Mikhailova N. A. Development of experimental recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. J. Act. Biotech. № 2 (21) 2017 г., С. 102].
2. Солдатенкова А. В. Моноклональные антитела для выявления нативного и рекомбинантного экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*: автореф. Дис. – М., 2016. [Soldatenkova A. V. Monoclonal antibodies for detection of native and recombinant toxinoid *Pseudomonas aeruginosa*. Author's abstract. diss. Moscow 2016].

ELISA FOR QUANTITATIVE DETECTION OF RECOMBINANT TOXOID IN THE COMPOSITION OF COMPLEX VACCINE AGAINST PSEUDOMONAS INFECTION

© 2018 A. V. Soldatenkova*, A. M. Kudryashova, O. V. Borisova,
N. A. Mikhailova

*E-mail: Sol.alena.v@yandex.ru

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

A method for quantitative determination of the component (toxoid) of the aluminum hydroxide sorbed vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* was developed and optimized. The vaccine was conditioned with a conjugate of specific antibodies with horseradish peroxidase. The resulting antibody-anatoxin-aluminum hydroxide complex was separated by centrifugation, non-bound antibodies were determined in supernatants by ELISA. The analysis of the three vaccine series showed that the amount of toxoid ranged from 91 to 104 µg/ml and had much in common with the concentration of toxoid in the control series – 100 µg/ml.

Key words: recombinant toxoid, recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine, ELISA

Authors:

Soldatenkova A. V., ✉ PhD, senior researcher of the Laboratory protective antigen, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; **E-mail:** Sol.alena.v@yandex.ru;

Borisova O. V., PhD, Head of the Laboratory of medical biotechnology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Kudryashova A. M., researcher of the Laboratory of medical biotechnology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia;

Mikhailova N. A., DrSci, Professor, PhD, Deputy Director for scientific work, Head of the Laboratory Protective Antigen Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia.

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА

© 2018 г. И. Л. Соловьева¹, Е. Н. Галич¹, М. П. Костинов^{3,4},
А. И. Кусельман¹, А. А. Соловьева¹, Ю. В. Антохина¹,
А. А. Гущина², М. А. Стенюшкина², В. В. Безик²

*E-mail: kate-reznikova@mail.ru

¹ФГБОУ ВО Ульяновский Государственный Университет, Ульяновск, Россия;

²ГУЗ «Областная детская клиническая больница им. Горячева», Ульяновск, Россия;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И. И. Мечникова», Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет
им. И. М. Сеченова» МЗ РФ, Москва, Россия

Система клеточного иммунитета играет немаловажную роль в развитии иммунного ответа при герпетической инфекции. Доказано, что клеточные механизмы определяют характер течения, частоту и интенсивность рецидивов герпетической инфекции. Особенности клеточного иммунитета при рецидивирующей герпетической инфекции изучены в основном у взрослых, в то время как среди детей таких исследований недостаточно. Цель исследования – изучить особенности клеточного иммунитета у детей, инфицированных вирусом герпеса человека 6 типа и у детей, имеющих микст-инфицирование вне обострения. Установлено, что при инфицировании герпетическими вирусами, не зависимо от моно- или микст инфицирования, при отсутствии острых клинических проявлений имеет место снижение содержания CD3⁺CD4⁺ Т лимфоцитов.

Ключевые слова: герпесвирусы, клеточный иммунитет, дети

DOI: 10.31857/S102872210002663-4