

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков, А.А. Калошин, И.М. Грубер

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

Контакты: Екатерина Алексеевна Курбатова kurbatova6162@yandex.ru

Введение. Пневмолизин (Ply) – гемолитический токсин *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), экспрессируемый всеми штаммами пневмококка. Для его качественного и количественного определения в биологических жидкостях простым, быстрым и эффективным способом может быть использование сэндвич-ИФА (иммуноферментного анализа).

Цель исследования – разработать и оценить специфичность сэндвич-ИФА тест-системы для качественного и количественного определения рекомбинантного Ply (rPly) *S. pneumoniae*.

Материалы и методы. В качестве распознающих антител в сэндвич-ИФА использовали кроличьи поликлональные антитела (ПкАТ) к rPly, иммобилизованные на твердой фазе. К ПкАТ (rPly) прибавляли исследуемые антигены (АГ). Реакцию проявляли детектирующими мышинными моноклональными иммуноглобулинами – IgG1 (rPly) – антителами, конъюгированными с пероксидазой корня хрена. Специфичность тест-системы оценивали при использовании в качестве референс-препаратов рекомбинантного α -гемолизина (α -Hly) и водорастворимых АГ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Результаты. С помощью сэндвич-ИФА rPly выявлен в концентрации 0,15 мкг/мл. Тест-система характеризовалась специфичностью, что подтверждено отсутствием реакции с α -Hly *S. aureus*. Референс-препараты водорастворимых поверхностных АГ штаммов *S. aureus* № 209, 1986, 1991 и Cowan I давали ложноположительную реакцию за счет присутствия в их составе протеина А (SpA) – термостабильного поверхностного белка, экспрессируемого многими штаммами стафилококка, способного связывать иммуноглобулины через Fc-фрагмент или Fab-фрагменты V₃H домена В-клеточного рецептора. Отрицательная реакция получена с АГ из штамма *S. aureus* Wood 46, не имеющего гена *sra*, кодирующего экспрессию SpA. Присутствие SpA в препаратах водорастворимых АГ *S. aureus* подтверждено в реакции ингибирования при ИФА.

Заключение. Разработан сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения Ply *S. pneumoniae*. Проведенные исследования подтвердили специфичность тест-системы.

Ключевые слова: рекомбинантный пневмолизин, рекомбинантный α -гемолизин, моноклональное антитело, белок А, сэндвич-ИФА

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для детекции рекомбинантного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(4):52–9. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yuri V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov, Alexey A. Kaloshin, Irina M. Gruber

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Malyy Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. Pneumolysin (Ply) is a hemolytic toxin of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) expressed by all strains of pneumococci. The use of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be a simple, fast and effective way of its qualitative and quantitative determination in biological fluids.

Aim. To develop and evaluate the specificity of sandwich ELISA test system for qualitative and quantitative determination of recombinant Ply (rPly) of *S. pneumoniae*.

Materials and methods. Immobilized on the solid phase rabbit's polyclonal antibodies (pAbs) to rPly were used as recognition antibodies in sandwich ELISA. The studied antigens were added to the pAbs (rPly). The reaction was manifested by using detecting mouse monoclonal IgG1 (rPly) – antibodies conjugated with horseradish root peroxidase. The specificity of the test system was evaluated when using recombinant α -hemolysin (α -Hly) and water-soluble *S. aureus* antigens as reference preparations.

Results. Using sandwich ELISA, rPly was detected at a concentration of 0.15 μ /ml. The test system was characterized by specificity, which was confirmed by the absence of reaction with recombinant α -Hly of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Reference preparations of water-soluble surface antigens of *S. aureus* strains No 209, 1986, 1991 and Cowan I gave a false positive reaction due to the presence of protein A (SpA) in their composition, a thermostable surface protein expressed by many strains of staphylococci capable of binding immunoglobulins via Fc-fragment or Fab fragments of the V₃H domain of the B cells receptor. A negative reaction was obtained with antigens from the *S. aureus* Wood 46 strain, which does not have the *spa* gene encoding SpA expression. The presence of protein A in preparations of water-soluble *S. aureus* antigens was confirmed in the ELISA inhibition assay.

Conclusion. Sandwich ELISA has been developed for qualitative and quantitative determination of *S. pneumoniae* Ply. The conducted studies have confirmed the specificity of the test system.

Keywords: recombinant pneumolysin, recombinant α -hemolysin, monoclonal antibody, protein A, sandwich ELISA

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Development of the test system based on enzyme immunoassay for the detection of recombinant *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2023;22(4):52–9. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-4-52-59>

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, пневмококк) является причиной инфекционно-воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей и патологических процессов другой анатомической локализации [1]. Наряду с пневмококком в последние годы отмечают увеличение частоты и тяжести заболеваний, вызываемых *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, золотистый стафилококк). Пневмония, вызванная возбудителем *S. aureus*, протекает тяжело, требует интенсивной терапии, а смертность достигает 29 % [2].

Общим свойством *S. pneumoniae* и *S. aureus* является способность к образованию гемолитических токсинов – пневмококкового пневмолизина (Ply) и стафилококкового α -гемолизина (α -Hly). Ply и α -Hly – факторы патогенности, которые играют важную роль в патогенезе заболеваний, вызываемых этими возбудителями [3–5]; Ply *S. pneumoniae* и α -Hly *S. aureus* обладают способностью образовывать поры в мембранах эукариотических клеток, что приводит к нарушению их целостности и последующей гибели [6–8].

Экспрессируемый всеми штаммами пневмококка Ply – высококонсервативный белок с цитолитической активностью, он относится к членам семейства холестеролзависимых цитолизин, которые формируют большие поры в эукариотических клетках, имеющих холестеролсодержащие мембраны, включая клетки иммунной системы [9, 10]. Присут-

ствие Ply в мокроте [11], моче [12] и других биологических жидкостях [13, 14] может указывать на инфекцию, вызванную *S. pneumoniae*.

При проникновении *S. aureus* в организм α -Hly связывается поверхностным мембранным рецептором – протеином 10, содержащим металлопротеиназный домен (ADAM-10), и образует мелкие поры в соматических клетках, в том числе иммунных. В результате активируется сигнальный путь, приводящий к экспрессии цитокинов или гибели клеток [5, 15, 16].

Наряду с микробиологическими и молекулярно-биологическими (масс-спектрометрией, полимеразной цепной реакцией) методами детекции этих патогенов [13, 14] не утрачивает своего значения иммунологическая диагностика, основанная на определении антигенов (АГ) бактерий в биологических жидкостях [11, 12]. Использование моноклональных антител (МкАТ и АТ соответственно) в сэндвич-ИФА (иммуноферментном анализе) для определения Ply *S. pneumoniae* в биологических жидкостях может быть простым, быстрым и эффективным способом выявления этого возбудителя. При этом необходимо исключить возможные перекрестные реакции Ply *S. pneumoniae* с другими гемолитическими токсинами, в частности с α -Hly *S. aureus*.

Цель исследования – оценить специфичность сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения рекомбинантного Ply (rPly) *S. pneumoniae*.

Материалы и методы

Рекомбинантный пневмолизин пневмококка экспрессирован в штамме *Escherichia coli* M-15/pSp-raPLY (депонирован в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» 04.03.2020, регистрационный номер В-9016) [17, 18].

Для получения α -гемолизина (α -Hly) *S. aureus* его кодирующая последовательность встроена в плазмидный вектор pQE-30 и экспрессирована в клетках *E. coli* штамма M15 с использованием синтетического индуктора изопропил- β -галактопиранозид. Очистку r-белка осуществляли на колонке с Ni-сефарозой в 8 М буферном растворе мочевины с последующим диализом против 50 мМ буферного раствора Tris-HCl pH 9,0. *In vitro* на эритроцитах кролика подтверждена гемолитическая активность очищенного r-белка.

Водорастворимые поверхностные АГ *S. aureus* № 209, 1986, 1991, Wood 46 и Cowan I (Центр коллективного пользования ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (НИИВС им. И.И. Мечникова) при финансовой поддержке проекта Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021) получены из инактивированных ацетоном микробных клеток из расчета 40 мг сухих клеток на 1 мл дистиллированной воды. Экстракцию поверхностных АГ проводили центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин.

Мыши линии BALB/c получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир, Россия). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217–2014). Дизайн исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

Моноклональные АТ к rPly получали путем слияния спленоцитов мышей линии BALB/c (самки), иммунизированных rPly (25 мкг/мышь), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг/мышь), 3-кратно с интервалом 14 сут с клетками мышшиной миеломы P3-X63-Ag8.653. Гибридизацию проводили на 3-и сутки после последней иммунизации. Выделение иммунных спленоцитов, слияние, культивирование культур, клонирование и селекцию технологичных клонов осуществляли в соответствии с протоколом получения МкАТ [19]. Выделение МкАТ (rPly) из асцитной жидкости мышей проводили методом двукратного осаждения сульфатом аммония. Для этого к 0,5 мл асцитной жидкости добавляли 0,5 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Образовавшуюся взвесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,5 мл 0,9 % изотоничес-

кого раствора натрия хлорида с последующим добавлением 0,5 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Смесь инкубировали в течение 4 ч при 4 °С. Образовавшуюся взвесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Осадок растворяли в 0,5 мл 0,15 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,2, диализовали против того же буфера в течение ночи при 4 °С и затем концентрировали с помощью полиэтиленгликоля с молекулярной массой 40 000 до объема 0,4 мл.

Изотип и специфичность МкАТ в супернатанте клонов и асцитической жидкости мышей определяли с помощью ИФА при использовании в качестве покрывающего лунки АГ rPly (5 мкг/мл), адсорбированного на полистироловых планшетах (Biomedicals, Россия). В качестве вторичных АТ использовали конъюгированные с пероксидазой антимышиные АТ иммуноглобулинов: IgM (μ -цепь), IgG (H+L), IgG1 (γ 1-цепь), IgG2a (γ 2a-цепь), IgG2b (γ 2b-цепь), IgG3 (γ 3-цепь) (Thermo Fisher Scientific, США). Оптическую плотность продуктов реакции определяли на микропланшетном ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм.

Моноклональные АТ rPly, меченные пероксидазой корня хрена (ПХ), получали путем перйодатного конъюгирования [20]. Для этого к 2 мг ПХ (Serva, ~1000 Ед/мг), растворенной в 0,5 мл деионизированной воды, добавляли 0,1 мл свежеприготовленного раствора 0,2 М перйодата натрия (NaIO_4) и перемешивали в течение 20 мин при 20 °С. Полученный ПХ-альдегид диализовали против 1 М натрий-ацетатного буфера pH 4,5 в течение 1 сут при 4 °С. С помощью 0,2 М карбонатного буфера доводили pH ПХ-альдегида до 9,5 и сразу добавляли 4 мг МкАТ, растворенных в 0,5 мл 0,001 М карбонатного буфера pH 9,5. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 20 °С. Далее к полученной смеси добавляли 0,05 мл свежеприготовленного раствора борогидрида натрия (NaBH_4) с концентрацией 4 мг/мл и выдерживали, периодически встряхивая, в течение 2 ч при 4 °С. Полученный конъюгат диализовали против 0,01 М ФСБ pH 7,2 в течение ночи при 4 °С. Активность конъюгата определяли с помощью ИФА при иммобилизации на твердой фазе rPly. Конъюгат стабилизировали добавлением 87 % глицерина в соотношении 1:1 и бычьего сывороточного альбумина в концентрации 5,0 мг/мл. Конъюгат хранили при температуре -18 °С.

Для получения ПкАТ (rPly) кролика 3-кратно иммунизировали rPly (разовая доза 50 мкг), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг). Интервал между иммунизациями составил 14 сут. Сыворотку получали на 14-е сутки после последней иммунизации. Выделение ПкАТ (rPly) проводили путем осаждения сульфатом аммония.

Для получения ПкАТ к протеину *A. S. aureus* (SpA) мышей ($n = 6$) иммунизировали двукратно внутрибрюшинно SpA (Pharmacia, Швеция) (50 мкг/мышь), адсорбированным на геле алюминия гидроксида (200 мкг). Выделение ПкАТ (SpA) проводили путем осаждения сульфатом аммония.

Содержание белка в препаратах определяли на спектрофотометре (Genesis, США) при длине волны 215 и 225 нм по формуле

$$[\text{белок}] \text{ мг/мл} = 144 (A_{215} - A_{225}) \times b,$$

где A – оптическая плотность, b – разведение пробы [21].

В препарате rPly содержание белка составило $1,5 \pm 0,1$ мг/мл, в α -Nly – $1,7 \pm 0,2$, в водорастворимых АГ в *S. aureus* – $4,5 \pm 1,8$ мг/мл, в ПкАТ (rPly) – $21,5 \pm 2,3$ мг/мл, в ПкАТ (SpA) – $14,7 \pm 1,8$ мг/мл, в МкАТ (rPly) – $9,5 \pm 1,3$ мг/мл.

Сэндвич-ИФА. Для качественного и количественного определения rPly использовали планшеты фирмы Dynatech M 129B, сенсibilизированные ПкАТ (rPly) в концентрации 5,0 мкг/мл 0,05 М карбонатного буфера pH 9,6 в объеме 100 мкл/лунка. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °С, после чего отмывали 0,15 М ФСБ pH 7,2, содержащими 0,05 % Твин-20. Исследуемые образцы препаратов (рекомбинантные или природные) вносили в лунки планшетов и делали последовательные двукратные разведения. Концентрация АГ в 1-й лунке в пересчете на белок составляла 5,0 мкг/мл. Контролем служили лунки с ФСБ. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, затем отмывали раствором ФСБ с 0,05 % Твин-20. Конъюгат МкАТ (rPly) – ПХ в разведении 1:2000 вносили по 100 мкл в каждую лунку планшета. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, затем отмывали и вносили по 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в каждую лунку. Инкубировали в темноте в течение 10 мин при 20 °С. Для остановки реакции использовали 1 М раствора H_2SO_4 , который вносили по 50 мкл в каждую лунку. Результаты учитывали на микропланшетном ИФА-ридере (iMark, Япония) при длине волны 450 нм.

Ингибирование сэндвич-ИФА. В 1-м варианте во все лунки планшета с иммобилизованными на их поверхности ПкАТ (rPly) вносили мышинные ПкАТ (SpA) в концентрации 5 мкг/мл и затем в растворе этих АТ титровали водорастворимые АГ *S. aureus* Cowan I, начиная с концентрации 5 мкг/мл, двукратным шагом. Во 2-м варианте вместо ПкАТ (SpA) вносили ПкАТ (rPly). Для подтверждения специфичности реакции сыворотку к SpA *S. aureus* ингибировали rPly. Все остальные этапы анализа проводили так, как описано ранее.

Статистическую обработку данных проводили методом Манна–Уитни для независимых выборок

при использовании программного обеспечения Statistica 10. Данные представлены средним значением \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Качественное и количественное определение rPly проводили с помощью сэндвич-ИФА. К иммобилизованному на планшете распознающим ПкАТ (rPly) прибавляли rPly в двукратно убывающих концентрациях начиная с 5 мкг/мл. Реакцию проявляли МкАТ (rPly) – ПХ. В качестве отрицательного контроля использовали ФСБ. МкАТ (rPly) – ПХ специфично взаимодействовали с rPly (рис. 1, а). Метод обладал достаточно высокой чувствительностью: наименьшая концентрация rPly составляла 0,15 мкг/мл. В качестве референс-препарата использовали α -Nly *S. aureus* и комплекс поверхностных водорастворимых АГ стафилококка. МкАТ (rPly) не реагировали с α -Nly стафилококка (рис. 1, б). Использование водорастворимых поверхностных АГ стафилококка в качестве референс-препаратов выявило неожиданный результат – МкАТ (rPly) – ПХ дозозависимо распознавали поверхностные АГ *S. aureus* № 209 (рис. 1, в).

Мы предположили, что такой результат может быть обусловлен взаимодействием Fc-фрагментов АТ, использованных в сэндвич-ИФА, с SpA, который продуцируют многие штаммы *S. aureus*.

Для решения этого вопроса были получены АГ из штаммов *S. aureus* № 1986, 1991, Cowan I и Wood 46, различающиеся по способности к экспрессии SpA.

Штаммы *S. aureus* № 1991 и 1986 содержали АГ, которые выявляли с помощью МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, а, б). АГ, полученные из штамма *S. aureus* Wood 46, отрицательного по гену *spa*, не вступали в реакцию с МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, в). Штамм *S. aureus* Cowan I, являющийся хорошим продуцентом SpA, наиболее интенсивно взаимодействовал с МкАТ (rPly) – ПХ (рис. 2, г).

Роль SpA в ложноположительных результатах сэндвич-ИФА подтверждена в реакции ингибирования при ИФА. Реакцию ингибирования связывания водорастворимых поверхностных АГ штамма *S. aureus* Cowan I с АТ проводили путем прибавления в сэндвич-систему мышинных ПкАТ к SpA (рис. 3, а) и кроличьих ПкАТ (rPly) (рис. 3, б). В обоих случаях наблюдали снижение оптической плотности продуктов реакции. Полученные данные указывают на наличие SpA в образцах поверхностных водорастворимых АГ штамма *S. aureus* Cowan I. В 3-м варианте вместо водорастворимых поверхностных АГ штамма *S. aureus* Cowan I использовали rPly, к которому прибавляли ПкАТ (SpA) (рис. 3, в). В этом случае ингибирования реакции не наблюдали.

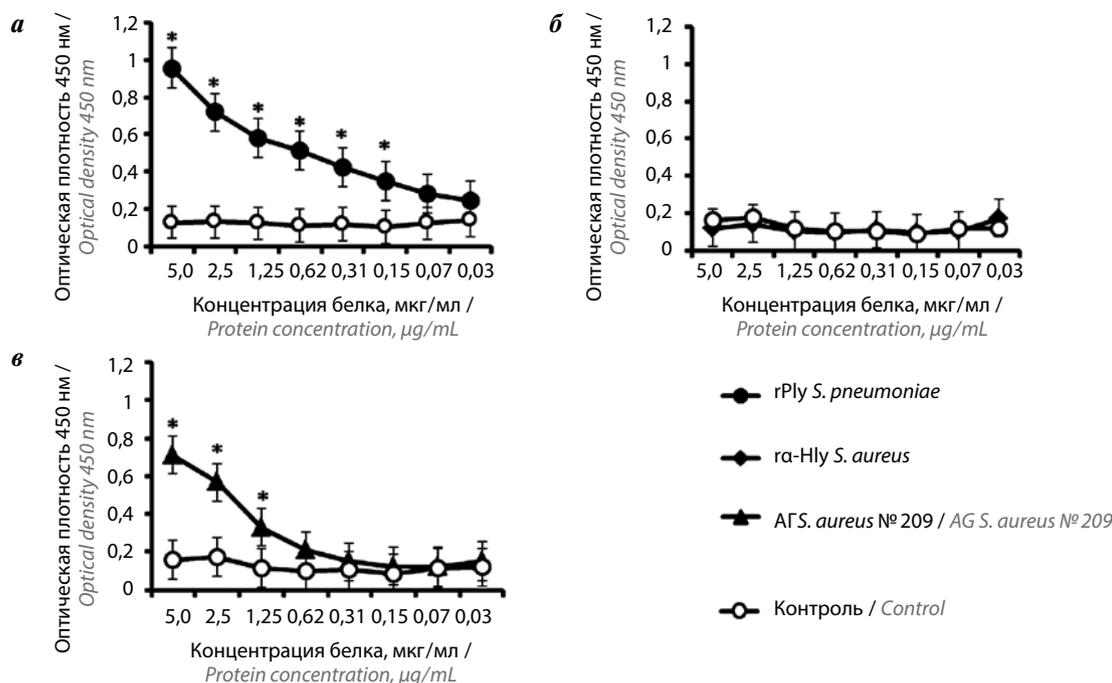


Рис. 1. Специфичность взаимодействия МкАТ (rPly) – ПХ с АГ: а – rPly; б – α -Hly *S. aureus*; в – АГ *S. aureus* № 209. Здесь и на рис. 3: МкАТ (rPly) – ПХ – моноклональные антитела к рекомбинантному пневмолизину, меченные пероксидазой корня хрена; rPly – рекомбинантный пневмолизин; α -Hly – рекомбинантный α -гемолизин. Здесь и на рис. 2, 3: АГ – водорастворимые поверхностные антигены; М – среднее значение; SD – стандартное отклонение; $M \pm SD$; * $p < 0,05$ между опытом и контролем, тест Манна–Уитни

Fig. 1. Specificity of the interaction of mAbs (rPly) – HPR with antigens: а – rPly; б – α -Hly of *S. aureus*; в – АГ of *S. aureus* No 209. Here and in fig. 3: mAbs (rPly) – HRP – monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin labeled with horseradish root peroxidase; rPly – recombinant pneumolysin; α -Hly – recombinant α -hemolysin. Here and in figs. 2, 3: АГ – water-soluble surface antigens; М – mean value; SD – standard deviation; $M \pm SD$; * $p < 0.05$ between experience and control, Mann–Whitney test

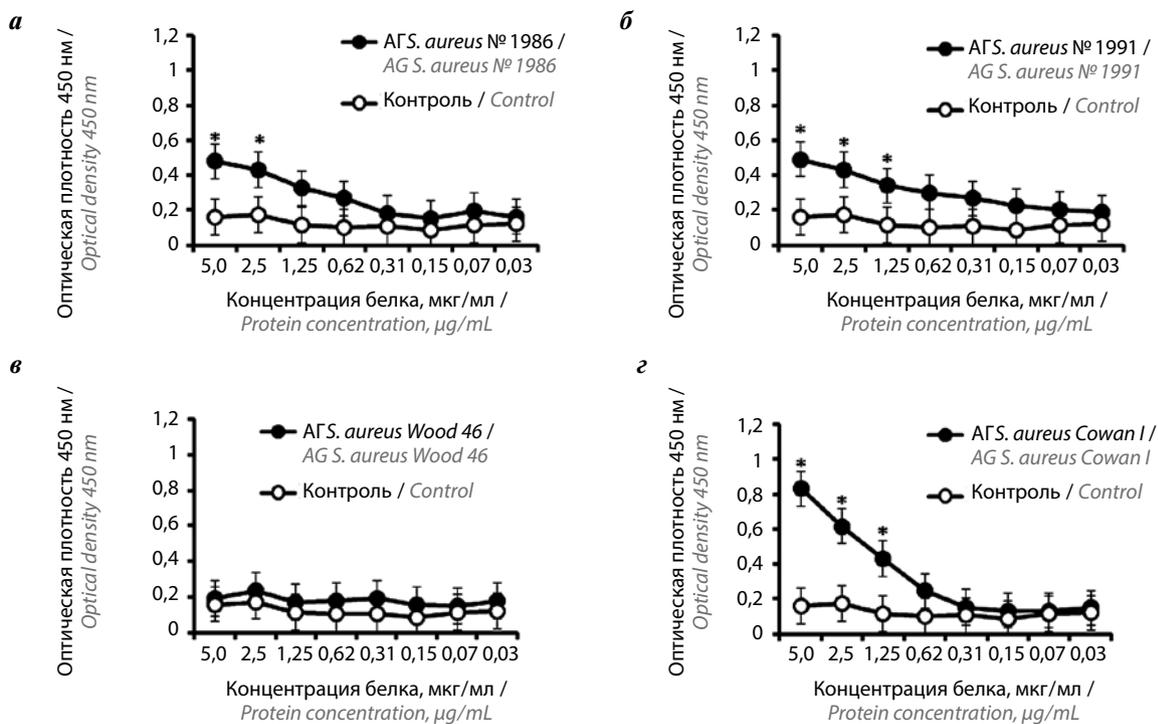


Рис. 2. Сэндвич-ИФА с поверхностными водорастворимыми АГ *S. aureus*: а – № 1986; б – № 1991; в – Wood 46; г – Cowan I

Fig. 2. Sandwich ELISA with surface water-soluble *S. aureus* antigens: а – No 1986; б – No 1991; в – Wood 46; г – Cowan I

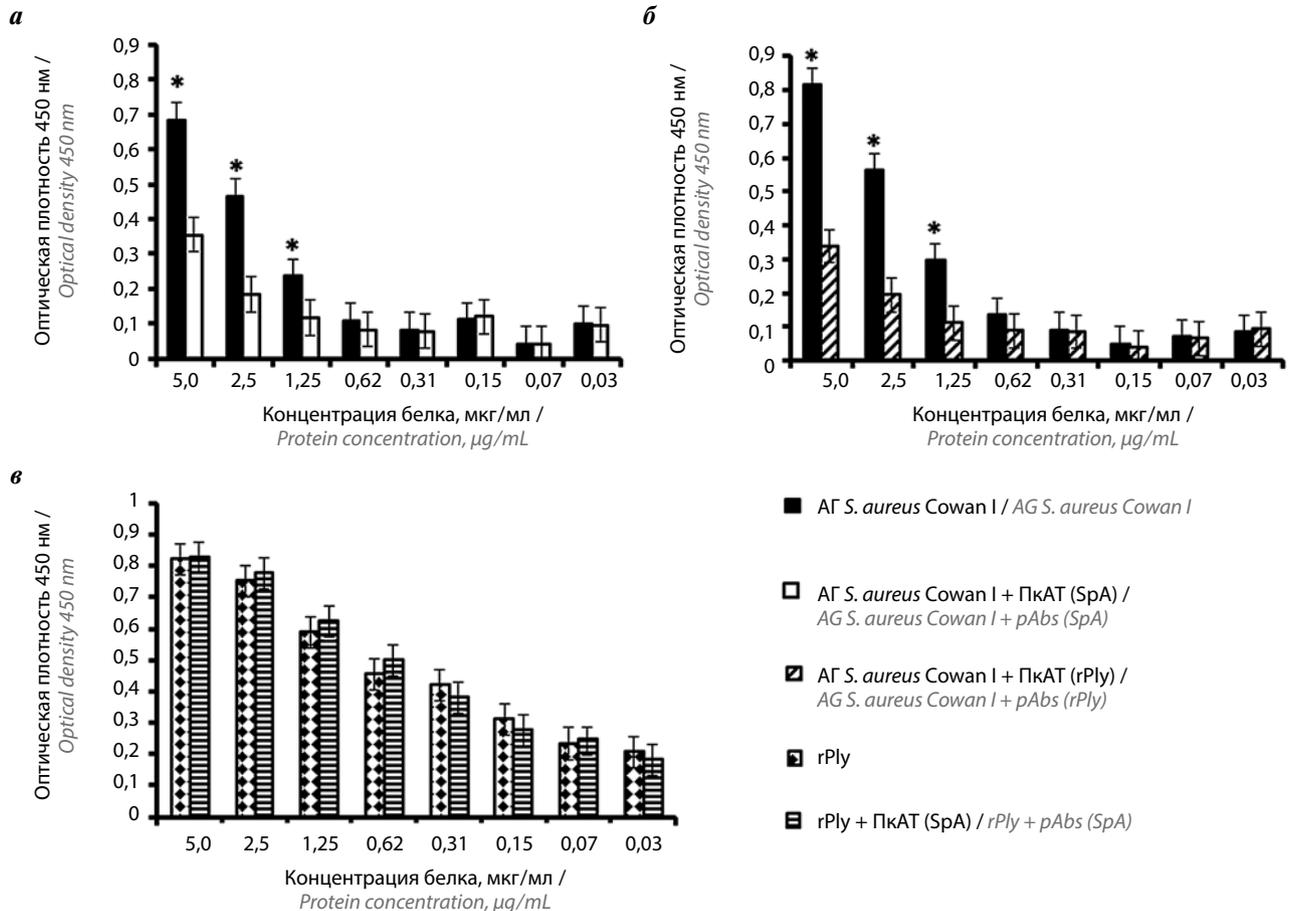


Рис. 3. Ингибирование сэндвич-ИФА. Распознающие антитела, иммобилизованные на планшете – ПкАТ (rPly); детектирующие антитела – МкАТ (rPly) – ПХ. Ингибирование: а – АГ *S. aureus* Cowan I и ПкАТ (SpA); б – АГ *S. aureus* Cowan I и ПкАТ (rPly); в – rPly и ПкАТ (SpA). ПкАТ (rPly) – поликлональные антитела к rPly; ПкАТ (SpA) – поликлональные антитела к протеину *A. S. aureus*

Fig. 3. Inhibition of sandwich ELISA. Recognizing antibodies immobilized on the plate – pAbs (rPly); detecting antibodies – mAbs (rPly) – HRP. Inhibition: a – AG of *S. aureus* Cowan I and pAbs (SpA); b – AG *S. aureus* Cowan I and pAbs (rPly); c – rPly and pAbs (SpA). pAbs (rPly) – polyclonal antibodies to rPly; pAbs (SpA) – polyclonal antibodies to *S. aureus* protein A

Полученные результаты ингибирования сэндвич-ИФА подтверждают то, что взаимодействие МкАТ (rPly) – ПХ с водными экстрактами *S. aureus*, кроме Wood 46, обусловлено присутствием в них белка А.

Обсуждение

В настоящем исследовании продемонстрирована специфичность распознающих IgG1-МкАТ (rPly) – ПХ, использованных в сэндвич-ИФА, предназначенном для качественного и количественного определения rPly пневмококка. При оценке специфичности МкАТ (rPly) – ПХ референс-препаратами служили α-Nly и водорастворимые поверхностные АГ *S. aureus*, полученные методом водной экстракции из инaktivированных ацетоном микробных клеток.

Установлено, что МкАТ (rPly) – ПХ специфично связывали rPly *S. pneumoniae* и не реагировали с α-Nly *S. aureus*. Препараты водорастворимых поверх-

ностных АГ *S. aureus* № 209, 1986, 1991 и Cowan I давали ложноположительную реакцию с МкАТ (rPly) – ПХ. Мы предположили, что причиной ложноположительных результатов являлось взаимодействие АТ, использованных в тест-системе, с протеином А *S. aureus* – термостабильным поверхностным белком, способным неспецифично связывать иммуноглобулины через Fc-фрагмент или Fab-фрагменты V₃H домена В-клеточного рецептора (IgM) [22, 23]. Большое количество штаммов стафилококка продуцирует протеин А, который получают путем лизиса бактериальной клетки или из супернатанта культуральной жидкости. Штамм *S. aureus* Cowan I известен как хороший продуцент белка А, а штамм Wood 46 характеризуется отсутствием гена *spa*, кодирующего экспрессию белка А [24, 25]. Соответственно, водорастворимые АГ *S. aureus* Wood 46 не взаимодействовали с МкАТ (rPly) – ПХ. Присутствие протеина А в водорастворимых препаратах стафилококка доказано

с помощью ингибирования сэндвич-ИФА. В 1-м варианте мышинные ПкАТ (SpA) специфично ингибировали связывание водорастворимых поверхностных АГ штамма стафилококка Cowan I с распознающими кроличьими ПкАТ (rPly). Во 2-м варианте поверхностные АГ стафилококка Cowan I неспецифично связывали ПкАТ (rPly), что подтверждало присутствие протеина А в составе комплекса водорастворимых поверхностных АГ стафилококка. Специфичность реакции подтверждена отсутствием ингибирования связывания rPly с кроличьими ПкАТ (rPly) при внесении в систему мышинных ПкАТ (SpA).

Продуцируемый всеми штаммами пневмококка Ply (молекулярная масса 53 кДа) является идеальным

молекулярным маркером для детекции пневмококка в биологических жидкостях. При оценке специфичности тест-систем, предназначенных для качественного и количественного определения Ply, следует критично интерпретировать результаты, полученные при использовании в качестве референс-препаратов водорастворимых АГ *S. aureus*, которые могут содержать протеин А с молекулярной массой 40–60 кДа [24].

Выводы

1. Получены МкАТ IgG1 изотипа к rPly пневмококка.
2. На основе МкАТ к rPly разработан сэндвич-ИФА для качественного и количественного определения Ply *S. pneumoniae* в биологических жидкостях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Groud J.A., Rich H.E., Alcorn J.F. Host-pathogen interactions in gram-positive bacterial pneumonia. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32:e00107-18. DOI: 10.1128/CMR.00107-18
2. Hageman J.C., Uyeki T.M., Francis J.S. et al. Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003-04 influenza season. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:894-9. DOI: 10.3201/eid1206.051141
3. Jahn K., Kohler T.P., Hammerschmidt S. et al. Bacterial adhesins and the pneumococcus. *Cells* 2022; 11:1121. DOI: 10.3390/cells11071121
4. Cockeran R., Anderson R., Feldman C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis* 2022; 15(3):235-9. DOI: 10.1097/00001432-200206000-00004
5. Bubeck Wardenburg J., Bae T., Otto M. et al. Poring over pores: Alpha-hemolysin and panton-valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus pneumonia*. *Nat Med* 2022; 13(12): 1405-6. DOI: 10.1038/nm1207-1405
6. Kebaier C., Chamberland R.R., Allen I.C. et al. *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J Infect Dis* 2012; 205(5):807-17. DOI: 10.1093/infdis/jir846
7. Cohen T.S., Jones-Nelson O., Hotz M. et al. *S. aureus* blocks efferocytosis of neutrophils by macrophages through the activity of its virulence factor alpha toxin. *Sci Rep* 2016; 6:35466. DOI: 10.1038/srep35466
8. Kitur K., Parker D., Nieto P. et al. Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of *Staphylococcus aureus* lung damage. *PLoS Pathog* 2015; 11(4):e1004820. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004820
9. Mitchell T.J., Dalziel C.E. The biology of pneumolysin. *Subcell Biochem* 2014; 80:145-60. DOI: 10.1007/978-94-017-8881-6_8
10. Gingerich A.D., Mousa J.J. Diverse mechanisms of protective anti-pneumococcal antibodies. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12:824788. DOI: 10.3389/fcimb.2022.824788
11. Wheeler J., Freeman R., Steward M. et al. Detection of pneumolysin in sputum. *J Med Microbiol* 1999; 48(9):863-6. DOI: 10.1099/00222615-48-9-863.8
12. Rajalakshmi B., Kanungo R., Srinivasan S., Badrinath S. Pneumolysin in urine: A rapid antigen detection method to diagnose pneumococcal pneumonia in children. *Indian J Med Microbiol* 2002; 20(4):183-6. PMID: 17657067
13. Matos J.A., Madureira D.J., Rebelo M.C. et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* meningitis by polymerase chain reaction amplification of the gene for pneumolysin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(5):559-63. DOI: 10.1590/s0074-02762006000500014
14. Lahti E., Mertsola J., Kontiokari T. et al. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25(12):783-9. DOI: 10.1007/s10096-006-0225-9
15. Becker R.E., Berube B.J., Sampedro G.R. Tissue-specific patterning of host innate immune responses by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *J Innate Immun* 2014; 6(5):619-631. DOI: 10.1159/000360006
16. Song L., Hobaugh M.R., Shustak C. et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 1996; 274(5294):1859-66. DOI: 10.1126/science.274.5294.1859
17. Воробьев Д.С., Сидоров А.В., Калошин А.А. и др. Получение рекомбинантной формы белка пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2022; 174(12):723-7. DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-723-727
Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Byulleten 'Eksperimental'noi Biologii i Meditsini = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2022; 174(12):723-7. (In Russ.) DOI: 10.47056/0365-9615-2022-174-12-723-727
18. Воробьев Д.С., Сидоров А.В., Калошин А.А. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК pSp-raPLY, кодирующая синтез рекомбинантного атоксичного белка пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*, штамм *Escherichia coli* M15/pSp-raPLY – продуцент рекомбинантной атоксичной формы пневмолизина и получение указанного белка для разработки вакцинного препарата для профилактики пневмококковых инфекций. Патент РФ №2782598 от 31.10.2022.
Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Recombinant plasmid DNA pSp-raPLY encoding the synthesis of recombinant atoxic pneumolysin protein *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* strain M15/pSp-raPLY is a producer of recombinant atoxic form of pneumolysin and obtaining this protein for the development of a vaccine preparation for the prevention of pneumococcal infections. RU 2 782 598C1. (In Russ.)

19. Broecker F., Anish C., Seeberger P.H. Generation of monoclonal antibodies against defined oligosaccharide antigens. *Methods Mol Biol* 2015;1331:57–80. DOI: 10.1007/978-1-4939-2874-3_5
20. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem* 1974;22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084
21. Segel I.H. *Biochemical calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry*. New-York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons Inc., 1976; 441 p.
22. Levinson A.I., Tar L., Carafa C., Haidar M. Potent stimulus of immunoglobulin M rheumatoid factor production. *J Clin Invest* 1986;78(3):612–7. DOI: 10.1172/JCI112617
23. Falugi F., Kim H.K., Missiakas D.M., Schneewind O. The role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2013; 4(5):e00575-13. DOI: 10.1128/mBio.00575-13
24. Rigi G., Ghaedmohammadi S., Ahmadian G.A. Comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 2019;66(3):454–64. DOI: 10.1002/bab.1742
25. Balachandran M., Giannone R.J., Bemis D.A., Kania S.A. Molecular basis of surface anchored protein A deficiency in the *Staphylococcus aureus* strain Wood 46. *PLoS One* 2017;12(8):e0183913. DOI: 10.1371/journal.pone.0183913

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
 И.В. Яковлева: получение моноклональных антител;
 Н.Ф. Гаврилова: разработка сэндвич-ИФА;
 Д.С. Воробьев: получение рекомбинантного пневмолизина;
 Е.С. Петухова: статистическая обработка данных;
 И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
 А.Е. Зайцев: получение сыворотки к протеину А;
 Ю.В. Волох: иммунизация животных;
 А.Ю. Леонова: культивирование штаммов микроорганизмов;
 А.В. Поддубиков: получение поверхностных антигенов микробных клеток;
 А.А. Калошин: получение рекомбинантного α -гемолизина;
 И.М. Грубер: характеристика штаммов микроорганизмов.

Author's contributions

E.A. Kurbatova: analysis of the data obtained and summarizing of results;
 I.V. Yakovleva: obtaining of monoclonal antibodies;
 N.F. Gavrilova: development of sandwich-ELISA;
 D.S. Vorobyev: obtaining of the recombinant pneumolysin;
 E.S. Petukhova: statistical analysis;
 I.B. Semenova: review of publications on the topic of article;
 A.E. Zaitsev: obtaining serum to protein A;
 Yu.V. Volokh: animal immunization;
 A.Yu. Leonova: cultivation of strains of microorganisms;
 A.V. Poddubikov: obtaining of surface antigens of microbial cells;
 A.A. Kaloshin: obtaining recombinant α -hemolysin;
 I.M. Gruber: characteristics of strains of microorganisms.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>
 И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>
 Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>
 Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
 Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
 И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
 А.Е. Зайцев / A.E. Zaitsev: <https://orcid.org/0000-0002-8434-231x>
 Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
 А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
 А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>
 А.А. Калошин / A.A. Kaloshin: <https://orcid.org/0000-0001-8679-2421>
 И.М. Грубер / I.M. Gruber: <https://orcid.org/0000-0002-1922-4660>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-20221.
Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No 22-25-20221.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 06.03.2023. **Принята в печать:** 13.10.2023.
Article received: 06.03.2023. **Accepted for publication:** 13.10.2023.