**РЕЗЮМЕ**

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

**РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА *P. AERUGINOSA***

ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва

Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, содержащий в своём составе аминокислотные последовательности трех наиболее значимых антигенов *P. aeruginosa* (мембранных белков OprF, OprI и анатоксина aTox) был включен в состав вакцины против синегнойной инфекции. Контроль качества гибридного рекомбинантного белка и вакцины на его основе предполагает определение его подлинности и полноты сорбции препарата на гидроксиде алюминия. Цель настоящего исследования ­- разработка иммуноферментного метода контроля качества вакцинного препарата на основе гибридного рекомбинантного белка *P. aeruginosa*. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, специфичные к слитому рекомбинантному белку, были получены путём слияния злокачественной линии миеломы мыши и иммунных спленоцитов мышей, вакцинированных отдельными рекомбинантными белками синегнойной палочки. Для наработки антител в препаративных количествах, гибридные клетки культивировали in vivo в мышах линии BALB/c. Супернатанты клеточных культур и асцитные жидкости хроматографически очищали на иммунном сорбенте. Конъюгирование антител с пероксидазой хрена проводили согласно методу Nakane P.K. Гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI выявляли в твёрдофазном иммуноферментном анализе с использованием полученной панели моноклональных антител и конъюгатов моноклональных антител с пероксидазой корня хрена, специфичных к различным эпитопам белка. В качестве калибровочных стандартов для построения калибровочного графика использовали разведения, содержащие от 78 нг/мл до 5000 нг/мл рекомбинантного белка OprF-aTox-OprI. Для детекции OprF-aTox-OprI апробированы 55 вариантов пар моноклональных антител, в 11 случаях показана способность выявлять рекомбинантный белок. Критерием отбора наиболее чувствительных и специфичных вариантов ИФА служил предел количественного обнаружения. Для всех 11 вариантов теста посчитан предел количественного обнаружения. В результате проведенных исследований были выбраны два варианта иммуноферментного анализа для контроля качества рекомбинантного слитого белка, обладающие наибольшей чувствительностью. Первый вариант включал в себя пару моноклональных антител, специфичных к эпитопам OprF и OprI, второй вариант- к эпитопам aTox и OprI. Пределы количественного обнаружения составили 2,9 нг/мл и 13,6 нг/мл (0,0058 % и 0,027 % от предполагаемого содержания антигена в вакцине) для первого и второго вариантов ИФА. Первый вариант позволяет определить количество белка и оценить полноту его сорбции на геле гидроокиси алюминия. Для подтверждения подлинности белка целесообразно применять оба метода, поскольку они позволяют доказать наличие всех трех антигенов (OprF, aTox и OprI) присутствующих в слитом белке.

***Ключевые слова:*** вакцина, *Pseudomonas aeruginosa*, гибридный рекомбинантный белок OprF-aTox-OprI, иммуноферментный анализ

A.V. Soldatenkova, A.M. Kudryashova, N.F. Gavrilova, I.V. Yakovleva, O.V. Borisova, V.V. Sviridov, N.A. Mikhailova

**DEVELOPMENT OF AN ELISA FOR THE QUALITY CONTROL OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA RECOMBINANT VACCINE BASED ON THE HYBRID RECOMBINANT PROTEIN**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

A hybrid recombinant protein containing the amino acid sequences of the three most significant antigens Pseudomonas aeruginosa (membrane proteins OprF, OprI and toxoid aTox) was included in a vaccine against Pseudomonas infection. Quality control of a hybrid recombinant protein and based on it vaccine involves determining the authenticity and completeness of adsorption to aluminum hydroxide adjuvant. The aim of the research is development of quality control methods for a vaccine based on the hybrid recombinant protein *P. aeruginosa* OprF-aTox-OprI. Hybridomas secreting specific monoclonal antibodies for OprF-aTox-OprI were derived from the fusion of myeloma cells and spleen cells from mice immunized with recombinant proteins *P. aeruginosa*. To generate antibodies in sufficient quantities, hybrid cells were cultured in vivo in BALB / c mice. Supernatants and ascites liquids were chromatographically purified on an immune sorbent. The conjugation of antibodies with horseradish peroxidase was carried out according to the method of Nakane P.K. A hybrid recombinant protein OprF-aTox-OprI was detected in solid phase ELISA using a panel of monoclonal antibodies and conjugates of monoclonal antibodies with horseradish peroxidase. Monoclonal antibodies were specific for different epitopes of OprF-aTox-OprI. Dilutions containing from 78 ng / ml to 5000 ng / ml of the recombinant OprF-aTox-OprI protein were used as calibration standards for constructing a calibration curve. To identify the recombinant protein OprF-aTox-OprI 55 variants of pairs of monoclonal antibodies were tested. The criterion for the selection of the most sensitive and specific variants ELISA was the limit of quantitative detection. The limit of quantitative detection was calculated for all 11 ELISA variants. Two ELISA variants with the highest sensitivity were selected for quality control of the recombinant fusion protein. The limits of quantitative detection were 2.9 ng / ml and 13.6 ng / ml (0.0058 and 0.027% of the estimated antigen content in the vaccine) for the first and second ELISA variants. The first variant included a pair of monoclonal antibodies specific for the OprF and OprI epitopes, the second variant - aTox and OprI epitopes. The first variant allows to determine the amount of protein and evaluate the completeness of its adsorption on an aluminum hydroxide. To confirm the authenticity of the protein both methods must be used, since they can prove the presence of all three antigens (OprF, aTox and OprI) that are present in the fusion protein.

***Keywords:*** vaccine, Pseudomonas aeruginosa, hybrid recombinant protein OprF-aTox-OprI, enzyme-linked immunoassay