

бактерии. Целью исследования было получить и дать характеристику моноклональным антителам к рекомбинантному антигену р60 *Listeria monocytogenes*. Для получения специфических антител иммунизировали мышей линии BALB/c с использованием очищенного рекомбинантного белка р60. Полученные спленоциты гибридизовали с раковыми клетками миеломы Х63-Аг 8.6.5.3 с применением полиэтиленгликоль PEG-1500. Скрининг гибридом проводили методом непрямого иммуноферментного анализа. В результате пяти независимых гибридизаций из 1386 исследованных гибридом 149 клонов проявили первичную специфическую активность. После многоэтапного отбора были выделены семь стабильных клонов-продуцентов. Наиболее высокую активность показали антитела клонов 1Н8 и 2А3 с титром 1:256 в культуральной жидкости и 1:204800 в асцитной жидкости. Отсутствие перекрестной реактивности с разными гетерологичными рекомбинантными белками подтвердило специфичность полученных антител. Моноклональные антитела перспективны для дальнейшей разработки иммунодиагностических методов выявления *L. monocytogenes*.

Ключевые слова: листериоз, *Listeria monocytogenes*, р60, рекомбинантный белок, моноклональные антитела, гибридома, иммуноферментный анализ.

Введение

Листериоз представляет собой инфекционное заболевание человека и животных, вызываемое преимущественно *Listeria monocytogenes*. Возбудитель относится к грамположительным факультативно-анаэробным бактериям и характеризуется способностью сохранять жизнеспособность при неблагоприятных условиях окружающей среды. Особое значение *L. monocytogenes* имеет как патоген пищевого происхождения, способный контаминировать различные виды сырья и готовой продукции [1]. Листериоз из болезней, регистрируемых преимущественно среди животных, превратился в одну из наиболее значимых пищевых зооантропонозных болезней в мире [2–3]. В связи с этим совершенствование методов специфического выявления возбудителя остается актуальным направлением ветеринарной и медицинской микробиологии.

Эффективность иммунологических методов выявления *L. monocytogenes* в значительной степени определяется выбором специфического антигена и качеством используемых антител. Перспективным подходом является применение рекомбинантных белков возбудителя, позволяющих получать стандартизованные антигенные препараты с заданными иммунологическими характеристиками. Одним из таких белков является р60 — иммуногенный белок *L. monocytogenes*, кодируемый геном *iap* (*invasion-associated protein*) [4–10]. р60 обладает мураин-гидролазной активностью, участвует в ремоделировании пептидогликана клеточной стенки и играет существенную роль в процессе деления бактериальных клеток. Кроме того, белок секретируется в окружающую среду в процессе роста бактерий, что повышает его доступность для распознавания иммунной системой [5].

Особенности структуры и выраженная иммуногенность р60 обуславливают интерес к нему как к потенциальной мишени для получения специфических антител. Ранее было показано, что антитела, направленные против отдельных эпитопов р60, могут различаться по характеру распознавания представителей рода *Listeria*. Это свидетельствует о наличии в структуре белка как консервативных, так и более специфичных антигенных детерминант и определяет необходимость тщательного отбора антител с требуемыми характеристиками.

В этом отношении особый интерес представляют моноклональные антитела, характеризующиеся однородностью, воспроизводимостью свойств и направленностью к определенной антигенной детерминанте. В отличие от поликлональных иммуноглобулинов, моноклональные антитела продуцируются одним клоном В-лимфоцитов и обладают одинаковой эпитопной специфичностью [6].

Важными этапами получения моноклональных антител являются выбор иммуногена, формирование выраженного специфического иммунного ответа у экспериментальных животных, гибридизация иммунных спленоцитов с миеломными клетками, селекция гибридных клеток и последующий многоэтапный скрининг. При этом первичная реактивность гибридомы не всегда свидетельствует о стабильности продукции специфических иммуноглобулинов [7–8]. Применение рекомбинантного р60 в качестве иммуногена позволяет направить иммунный ответ непосредственно на белковые детерминанты *L. monocytogenes* и представляет интерес для получения моноклональных иммунореагентов [9]. На начальном

этапе исследования проводилась иммунизация мышей BALB/c p60, после получения гибридом, их многоступенчатый отбор и выделение стабильных производителей специфических антител.

Цель исследования заключалась в создании моноклональных антител, специфичных к рекомбинантному антигену p60 *L. monocytogenes*, с последующей оценкой их иммунохимических характеристик и селекцией стабильных гибридных клонов, продуцирующих антитела с высокой иммунореактивностью.

Материалы и методы исследований

Для индукции специфического иммунного ответа применяли рекомбинантный p60 *L. monocytogenes*, полученный с использованием генно-инженерных технологий. Для получения фидерного слоя, необходимого при культивировании гибридом, использовали перитонеальные макрофаги, выделенные от 50 беспородных (outbred) мышей. Полученные клетки вносили в лунки культуральных планшетов с целью создания условий для роста гибридом.

Иммунизация мышей. Получение иммунного ответа у экспериментальных животных. Для индукции образования специфических антител мышам линий BALB/c вводили рекомбинантный белок p60 в количестве 25 и 50 мкг на животное. Первичную иммунизацию проводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл в смеси с неполным адъювантом Фрейнда. На 7-е сутки осуществляли повторное введение антигена в аналогичной дозе с полным адъювантом Фрейнда в таком же объеме внутрибрюшинно. На 11, 12 и 13-е сутки проводили бустерную иммунизацию соответствующей дозой рекомбинантного p60 в фосфатном солевом буфере.

Уровень специфического гуморального иммунного ответа оценивали по титру антител к p60 в сыворотке крови методом непрямого иммуноферментного анализа. Для последующей гибридизации отбирали животных с наиболее хорошим иммунным ответом.

Получение гибридом. После иммунизации у отобранных животных были выделены спленоциты и они использовались в качестве источника иммунных В-лимфоцитов. Полученные клетки из селезенки мышей были гибридизированы клетками миеломы X63-Ag 8.6.5.3 по методу V. Oi и L. Herzenberg [8]. В качестве агента, обеспечивающего слияние клеток, применяли PEG-1500.

После гибридизации клетки культивировали в селективной *HAT*-среде, что обеспечивало отбор гибридных клеток. Для культивирования использовали среду *RPMI*-1640, содержащую 10% сыворотки плода коровы. Полученные гибридомы клонировали методом лимитирующих разведений.

Скрининг гибридом методом непрямого ИФА. Первичный и последующие этапы отбора гибридом, продуцирующих антитела к p60, проводили методом непрямого ИФА. Лунки 96-луночных полистирольных планшетов сенсibilизировали рекомбинантным p60 в концентрации 0,001 мг/мл. В качестве исследуемых образцов использовали культуральные супернатанты гибридом. Связавшиеся с антигеном иммуноглобулины выявляли с помощью конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой. В качестве хромогенного субстрата применяли ТМВ. Оптическую плотность (ОП) реакционной смеси измеряли при длине волны 450 нанометр. Гибридомы, демонстрировавшие устойчивую специфическую реакцию с рекомбинантным p60 при последовательных этапах скрининга, отбирали для дальнейшего клонирования и характеристики.

Получение и очистка моноклональных антител. Для выделения моноклональных антител из асцитической жидкости предварительно получали препарат иммуноглобулинов. С этой целью гибридные клетки, продуцирующие целевые антитела, вводили сингенным мышам, предварительно обработанным прианом. Полученную асцитическую жидкость использовали в качестве исходного материала для последующего выделения и очистки моноклональных иммуноглобулинов.

Антитела предварительно осаждали сульфатом аммония, после чего подвергали аффинной очистке на колонках *MabTrap*. Полученные препараты использовали для определения специфической активности и последующей иммунохимической характеристики.

Оценка специфичности моноклональных антител. Специфическую активность отобранных моноклональных антител определяли методом непрямого ИФА. В качестве гомологичного антигена использовали рекомбинантный p60 *L. monocytogenes*. Для оценки возможной перекрестной реактивности применяли гетерологичные рекомбинантные белки

Lip32 Leptospira hebdomadis и BP26 *Brucella abortus*. Активность антител оценивали по максимальному разведению культурального супернатанта или асцитической жидкости, при котором сохранялась специфическая реакция с антигеном.

Результаты исследования

Иммуногенность рекомбинантного антигена *p60* оценивали на мышах линий *BALB/c* с использованием двух доз белка. Животным вводили антиген в количестве 25-50 мкг с целью индукции специфического гуморального ответа. Сравнительный анализ полученных результатов позволил установить дозу рекомбинантного *p60*, обеспечивающую наиболее выраженную продукцию специфических антител (табл. 1).

Таблица 1 – Индукция клонов В-лимфоцитов в селезенках иммунизированных мышей линии *BALB/c*

Антиген	Доза <i>p60</i>	Средний титр антител (M±m) (n=3)	Среднее количество В – лимфоцитов в селезенке ($\times 10^6$, n=3)
Рекомбинантный белок <i>p60</i>	25 мкг	1:10666±2133	57,3±4,7
	50 мкг	1:21333±4266	83,3±9,1

При введении 25 мкг *p60* средний титр специфических антител составил 1:10666±2133, а количество В-лимфоцитов в селезенке – $(57,3 \pm 4,7) \times 10^6$ клеток. Увеличение дозы антигена до 50 мкг сопровождалось повышением среднего титра антител до 1:21333±4266 и количества В-лимфоцитов до $(83,3 \pm 9,1) \times 10^6$ клеток. Таким образом, доза 50 мкг обеспечивала более выраженный иммунный ответ и была предпочтительной для получения иммунных спленоцитов с высокой антигенспецифической активностью.

Получение и первичный скрининг гибридом

С целью получения стабильных продуцентов моноклональных антител было проведено пять независимых гибридизаций иммунных спленоцитов мышей *BALB/c* с клетками миеломы X63-Ag 8.6.5.3. В зависимости от серии гибридизации клетки высевали в 384–576 лунок. Рост гибридом наблюдали в 166–387 лунках, при этом эффективность гибридизации варьировала в пределах 43,2–67,1%.

Всего методом непрямого ИФА было исследовано 1386 гибридом. На этапе первичного скрининга специфическая реактивность в отношении рекомбинантного *p60* была выявлена у 149 гибридомы.

Результаты свидетельствовали об успешной гибридизации и формировании популяции гибридных клеток, которые были способны продуцировать антитела, распознающие рекомбинантный белок *p60* (табл. 2).

Таблица 2 – Эффективность получения гибридом при слиянии клеток миеломы X63-Ag 8.6.5.3 со спленоцитами мышей *BALB/c* после иммунизации рекомбинантным антигеном *p60*

№ гибридизации	Количество введенного иммуногена	Общее количество засеянных лунок	Лунки зарегистрированным ростом гибридом		Доля клонов, продуцирующих специфические МКА	
			количество	%	количество	%
1	50 мкг	576	397	68,9	38	9,57
2		480	302	62,9	36	11,9
3		384	276	71,8	25	9,05
4	25 мкг	384	224	58,3	29	7,55
5		384	187	48,6	21	11,2
Итого		2208	1386	62,1	149	11,9

По результатам проведенных экспериментов доля гибридных клонов, продуцирующих специфические моноклональные антитела, варьировала 7,55% до 11,9 %. Полученные показатели указывают на достаточную представленность антиген-специфических В-лимфоцитов в исходной клеточной популяции и создают предпосылки для

последующей селекции перспективных клонов с требуемой антителопродуцирующей активностью.

Скрининг и селекция гибридных клонов-продуцентов

Положительные гибридомы подвергали последовательному многоэтапному скринингу с целью оценки стабильности секреции специфических иммуноглобулинов. В ходе дальнейшего культивирования значительная часть первоначально положительных культур утратила выраженную антигенсвязывающую активность.

К четвертому этапу скрининга 94,2% первоначально отобранных гибридом либо утратили способность связываться с рекомбинантным р60, либо секретируют антитела в низких титрах – преимущественно 1:2–1:4.

Стабильная секреция специфических иммуноглобулинов была выявлена у семи клонов гибридом: 1Н8, 2А3, 2G4, 5F9, 5D2, 6B9 и 7Е7. В ходе последовательного ИФА-скрининга культуральных супернатантов наблюдалось снижение или утрата активности отдельных клонов, поэтому дальнейший отбор проводили с учётом уровня и стабильности продукции специфических антител. Клоны 1Н8, 2А3 и 7Е7, характеризовавшиеся наиболее высокой и устойчивой антителопродуцирующей активностью, были отобраны для последующего клонирования методом лимитирующих разведений. Максимальные титры специфических антител в культуральных супернатантах отобранных клонов варьировали в диапазоне от 1:16 до 1:256. Таким образом, многоэтапный скрининг позволил существенно сузить исходную популяцию гибридом и выделить клеточные линии, характеризующиеся стабильной продукцией р60-специфических иммуноглобулинов.

Характеристика моноклональных антител клонов 1Н8, 2А3 и 7Е7

Для дальнейшего исследования были выбраны гибридные клоны 1Н8, 2А3 и 7Е7, показавшие стабильную продукцию специфических антител.

Активность моноклональных антител оценивали методом непрямого иммуноферментного анализа в культуральных супернатантах и асцитной жидкости (табл. 3).

Таблица 3 – Оценка специфичности и иммунореактивности моноклональных антител, секретируемых гибридными клонами 1Н8, 2А3 и 7Е7

Антигены	1Н8	2А3	7Е7
<i>p60 L. monocytogenes</i> , культуральный супернатант	1:256	1:256	1:128
<i>p60 L. monocytogenes</i> , асцитная жидкость	1:204800	1:204800	1:102400
<i>Lip32 L. hebdomadis</i>	отрицательно	отрицательно	отрицательно
<i>BP26 B. abortus</i>	отрицательно	отрицательно	отрицательно

Для клона 7Е7 была установлена высокая антителопродуцирующая активность, хотя зарегистрированные значения титров (1:128 и 1:102 400) уступали показателям, полученным для гибридом 1Н8 и 2А3.

Оценка специфичности полученных моноклональных антител. Одним из основных критериев отбора перспективных моноклональных антител являлось отсутствие неспецифического взаимодействия с гетерологичными белковыми антигенами.

При исследовании антител клонов 1Н8, 2А3 и 7Е7 методом непрямого ИФА не было выявлено взаимодействия с рекомбинантными белками *Lip32 Leptospira hebdomadis* и *BP26 Brucella abortus*. В то же время все три препарата активно взаимодействовали с гомологичным рекомбинантным *p60 L. monocytogenes*.

Полученные данные подтверждают направленную антигенсвязывающую активность исследованных моноклональных антител в отношении рекомбинантного *p60* в пределах использованной панели гетерологичных антигенов.

На следующем этапе исследования была проведена сравнительная оценка иммунохимических характеристик моноклональных антител, продуцируемых наиболее перспективными гибридными клонами 1Н8, 2А3 и 7Е7. Для характеристики антител определяли их субклассовую принадлежность, специфическую активность по титру в культуральной жидкости и после очистки, а также константу связывания с рекомбинантным антигеном *p60* (табл. 4).

Таблица 4 – Иммунохимические свойства моноклональных антител.

Наименование	Субкласс антител	Титр антител в культуре клеток	Титр антител после очистки	Константа связывания
1Н8	<i>IgG₁</i>	1:256	1:204800	$2,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$
2А3	<i>IgG₁</i>	1:256	1:204800	$1,5 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$
7Е7	<i>IgG_{2a}</i>	1:128	1:102400	$7,5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$

Анализ изотипической принадлежности полученных моноклональных антител показал различия между исследуемыми гибридными клонами. Антитела, секретируемые клонами 1Н8 и 2А3, были отнесены к подклассу *IgG₁*, тогда как продукт клона 7Е7 принадлежал к *IgG_{2a}*. При культивировании гибридом 1Н8, 2А3 и 7Е7 титр специфических антител в культуральной среде достигал 1:256, 1:256 и 1:128 соответственно.

Обсуждение научных результатов

Получение моноклональных антител с заданной специфичностью во многом определяется иммуногенностью выбранного антигена, эффективностью формирования В-клеточного ответа и последующим отбором стабильных гибридных клонов. В настоящем исследовании в качестве иммуногена был использован очищенный рекомбинантный белок *p60 L. monocytogenes*, электрофоретическая чистота которого составляла не менее 98%. Полученные результаты показали, что данный белок способен индуцировать выраженный специфический гуморальный иммунный ответ у мышей линии *BALB/c*.

Сравнение двух исследованных доз антигена продемонстрировало зависимость интенсивности иммунного ответа от количества вводимого рекомбинантного *p60*. При дозе 25 мкг средний титр специфических антител составлял $1:10666 \pm 2133$, тогда как увеличение дозы до 50 мкг сопровождалось повышением титра до $1:21333 \pm 4266$. Одновременно среднее количество В-лимфоцитов в селезенке увеличивалось с $(57,3 \pm 4,7) \times 10^6$ до $(83,3 \pm 9,1) \times 10^6$ клеток. Таким образом, применение 50 мкг рекомбинантного *p60* обеспечивало более выраженную стимуляцию гуморального иммунного ответа и создавало благоприятные условия для последующего получения антиген специфических гибридом.

Важным этапом работы являлось получение стабильных гибридных клеточных линий. Проведение пяти независимых гибридизаций позволило получить значительное количество гибридных культур, при этом эффективность слияния клеток находилась в пределах 43,2–67,1%. Из 1386 исследованных гибридом 149 культура, на этапе первичного скрининга продуцировала антитела, взаимодействующие с рекомбинантным *p60*.

Вместе с тем первичная положительная реакция гибридом не являлась достаточным критерием для их использования в качестве продуцентов моноклональных антител. В процессе последующего культивирования и повторного скрининга у значительной части первоначально положительных культур отмечалась потеря или существенное снижение антигенсвязывающей активности. К четвертому этапу скрининга 94,2% исходно отобранных гибридом либо утратили способность взаимодействовать с *p60*, либо продуцировали антитела в низких титрах. В результате многоэтапной селекции были выделены семь стабильных клонов – 1Н8, 2А3, 2G4, 5F9, 5D2, 6B9 и 7Е7.

Полученные данные подчеркивают необходимость проведения последовательного скрининга и клонирования гибридом при разработке моноклональных иммунореагентов. Стабильность продукции антител представляет собой не менее важный показатель, чем их первоначальная реактивность с целевым антигеном.

Наиболее перспективными по уровню специфической активности оказались клоны 1Н8 и 2А3. Титр продуцируемых ими антител в культуральном супернатанте составлял 1:256, а в асцитической жидкости достигал 1:204800. Для клона 7Е7 эти показатели составляли соответственно 1:128 и 1:102400. Высокие титры антител, продуцируемых клонами 1Н8 и 2А3, позволяют рассматривать данные клеточные линии в качестве перспективных продуцентов моноклональных иммуноглобулинов к *p60*.

При оценке специфичности антител клонов 1Н8, 2А3 и 7Е7 взаимодействия с гетерологичными рекомбинантными белками *Lip32 Leptospira hebdomadis* и BP26 *Brucella abortus* обнаружено не было. Полученный результат свидетельствует об отсутствии перекрестной реактивности с исследованными гетерологичными антигенами.

Таким образом, комплексная оценка полученных гибридом показала, что использование рекомбинантного *p60* в качестве иммуногена обеспечивает возможность получения стабильных продуцентов моноклональных антител. Среди исследованных клонов наиболее перспективными являются 1Н8 и 2А3, сочетающие стабильность продукции и высокую активность антител. Полученные моноклональные антитела могут служить основой для дальнейшего изучения антигенных свойств *p60* и разработки иммунологических подходов к выявлению *L. monocytogenes*.

Заключение.

В результате проведенного исследования получены стабильные гибридомные клеточные линии, продуцирующие моноклональные антитела к рекомбинантному антигену *p60 L. monocytogenes*.

Установлено, что рекомбинантный *p60* обладает выраженными иммуногенными свойствами. Иммунизация мышей *BALB/c* антигеном в дозе 50 мкг обеспечивала средний титр специфических антител $1:21333 \pm 4266$ и увеличение количества В-лимфоцитов селезенки до $(83,3 \pm 9,1) \times 10^6$ клеток.

В результате пяти независимых гибридизаций было исследовано 1386 гибридом, из которых 149 проявила первичную реактивность в отношении *p60*. После многоэтапного скрининга отобраны семь стабильных клонов-продуцентов: 1Н8, 2А3, 2G4, 5F9, 5D2, 6B9 и 7E7.

Наиболее высокой активностью характеризовались моноклональные антитела клонов 1Н8 и 2А3, титр которых достигал 1:256 в культуральном супернатанте и 1:204800 в асцитической жидкости. Перекрестного взаимодействия исследованных антител с рекомбинантными антигенами *Lip32 L. hebdomadis* и *BP26 B. abortus* не выявлено.

Полученные результаты позволяют рассматривать гибридомные клоны 1Н8 и 2А3 как перспективные продуценты моноклональных антител к *p60 L. monocytogenes* для дальнейшего использования при создании специфических иммунодиагностических реагентов.

Список литературы

1. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2021. – Vol. 47. – P. 647–666. – DOI: 10.1080/1040841X.2021.1911930.
2. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 2020. – Vol. 87. – P. 1–20. – DOI: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.
3. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology // *Virulence*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509–2545. – DOI: 10.1080/21505594.2021.1975526.
4. Ravindhiran R., Sivarajan K., Sekar J.N., Murugesan R., Dhandapani K. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions // *Microbial Ecology*. – 2023. – Vol. 86, No. 4. – P. 2231–2251. – DOI: 10.1007/s00248-023-02269-9.
5. Koopmans M.M., Brouwer M.C., Vázquez-Boland J.A., van de Beek D. Human Listeriosis // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2023. – Vol. 36, No. 1. – DOI: 10.1128/cmr.00060-19.
6. Fogaça M.B.T., Bhunia A.K., Lopes-Luz L., Almeida E.P.R.P., Vieira J.D.G., Bühner-Sékula S. Antibody- and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for *Listeria monocytogenes* detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 413, No. 16. – P. 4161–4180. – DOI: 10.1007/s00216-021-03402-8.
7. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 32–46. – DOI: 10.1038/nrmicro.2017.126.
8. Oi V.T., Herzenberg L.A. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines // *Selected Methods in Cellular Immunology* / eds. B.B. Mishell, S.M. Shiigi. – San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980. – P. 351–372.
9. Moreira G.M.S.G., Gronow S., Dübel S., Mendonça M., Moreira Â.N., Conceição F.R., Hust M. Phage display-derived monoclonal antibodies against Internalins A and B allow specific detection

of *Listeria monocytogenes* // *Frontiers in Public Health*. – 2022. – Vol. 10. – Art. 712657. – DOI: 10.3389/fpubh.2022.712657.

10. Wuenscher M.D., Köhler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – Vol. 175, No. 11. – P. 3491–3501. – DOI: 10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993.

References

1. Lopes-Luz L., Mendonça M., Bernardes Fogaça M., Kipnis A., Bhunia A.K., Bühner-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2021. – Vol. 47. – P. 647–666. – DOI: 10.1080/1040841X.2021.1911930.

2. Matle I., Mbatha K.R., Madoroba E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis // *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. – 2020. – Vol. 87. – P. 1–20. – DOI: 10.4102/ojvr.v87i1.1869.

3. Quereda J.J., Morón-García A., Palacios-Gorba C., Dessaux C., García-Del Portillo F., Pucciarelli M.G., Ortega A.D. Pathogenicity and virulence of *Listeria monocytogenes*: a trip from environmental to medical microbiology // *Virulence*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2509–2545. – DOI: 10.1080/21505594.2021.1975526.

4. Ravindhiran R., Sivarajan K., Sekar J.N., Murugesan R., Dhandapani K. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions // *Microbial Ecology*. – 2023. – Vol. 86, No. 4. – P. 2231–2251. – DOI: 10.1007/s00248-023-02269-9.

5. Koopmans M.M., Brouwer M.C., Vázquez-Boland J.A., van de Beek D. Human Listeriosis // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2023. – Vol. 36, No. 1. – DOI: 10.1128/cmr.00060-19.

6. Fogaça M.B.T., Bhunia A.K., Lopes-Luz L., Almeida E.P.R.P., Vieira J.D.G., Bühner-Sékula S. Antibody- and nucleic acid-based lateral flow immunoassay for *Listeria monocytogenes* detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. – Vol. 413, No. 16. – P. 4161–4180. – DOI: 10.1007/s00216-021-03402-8.

7. Radoshevich L., Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – Vol. 16. – P. 32–46. – DOI: 10.1038/nrmicro.2017.126.

8. Oi V.T., Herzenberg L.A. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines // *Selected Methods in Cellular Immunology* / eds. B.B. Mishell, S.M. Shiigi. – San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1980. – P. 351–372.

9. Moreira G.M.S.G., Gronow S., Dübel S., Mendonça M., Moreira Â.N., Conceição F.R., Hust M. Phage display-derived monoclonal antibodies against Internalins A and B allow specific detection of *Listeria monocytogenes* // *Frontiers in Public Health*. – 2022. – Vol. 10. – Art. 712657. – DOI: 10.3389/fpubh.2022.712657.

10. Wuenscher M.D., Köhler S., Bubert A., Gerike U., Goebel W. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – Vol. 175, No. 11. – P. 3491–3501. – DOI: 10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993.

Информация о финансировании: Работа проведена в рамках реализации научного проекта №BR218004/0223, финансируемого Комитетом науки и высшего образования республики Казахстан («Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям»).

Г. Қауқабәева¹, С.Ескендірова¹

¹ «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, Қазақстан Республикасы, 010000, Астана,
Қорғалжын тас жолы 13/5,
e-mail: kaukabaeva@biocenter.kz

***LISTERIA MONOCYTOGENES* РЕКОМБИНАНТТЫ Р60 АНТИГЕНІНЕ ҚАРСЫ
МОНОКЛОНАЛДЫ АНТИДЕНЕЛЕРДІ АЛУ ЖӘНЕ СИПАТТАУ**

Листерияоз – адам мен жануарларда кездесетін, *Listeria monocytogenes* қоздырғышы тудыратын жұқпалы ауру. Қоздырғышты анықтаудың иммунологиялық әдістерін жетілдірудің перспективалы бағыттарының бірі бактерияның иммуногенді нәруыздарына телімді моноклоналды антиденелер алу болып табылады. Зерттеудің мақсаты *L. monocytogenes*-тің рекомбинантты р60 антигеніне қарсы моноклоналды антиденелер алу және олардың иммунологиялық қасиеттерін сипаттау болды. BALB/c желісіндегі тышқандарды иммундеу үшін тазартылған рекомбинантты р60 нәруызы қолданылды. Иммундық спленоциттер PEG-1500 көмегімен Х63-Аг 8.6.5.3 миелома жасушаларымен гибридтелді. Гибридомаларды скринингтеу жанама иммундық-ферменттік талдау әдісімен жүргізілді. Бес тәуелсіз гибридизациялау нәтижесінде зерттелген 1386 гибридоманың 149-ы рекомбинантты р60 антигеніне бастапқы телімді белсенділік көрсетті. Көпсатылы іріктеу нәтижесінде моноклоналды антиденелерді тұрақты өндіретін жеті гибридомалық клон алынды. 1Н8 және 2А3 клондарының антиденелері ең жоғары белсенділік көрсетіп, олардың титрі культуралық сұйықтықта 1:256, ал асциттік сұйықтықта 1:204800 деңгейіне жетті. Зерттелген гетерологиялық рекомбинантты антигендермен айқаспалы реактивтілік анықталған жоқ. Бұл нәтиже алынған антиденелердің жоғары телімділігін көрсетеді. Алынған моноклоналды антиденелер *L. monocytogenes*-ті анықтауға арналған иммунодиагностикалық реагенттерді одан әрі әзірлеу үшін перспективалы болып табылады.

Кілт сөздер: листерияоз, *Listeria monocytogenes*, р60, рекомбинантты антиген, моноклоналды антиденелер, гибридома, иммуноферменттік талдау.

G.Kaukabayeva¹, S.Eskendirova¹

¹LLP «National Center for Biotechnology», Republic of Kazakhstan. 010000, Astana, Korgalzhyn Highway 13/5

e-mail: kaukabaeva@biocenter.kz

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE RECOMBINANT P60 ANTIGEN OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Listeriosis is an infectious disease affecting humans and animals caused by *Listeria monocytogenes*. One promising approach to improving immunological methods for pathogen detection is the production of specific monoclonal antibodies against immunogenic bacterial proteins. The aim of this study was to generate and characterize monoclonal antibodies against the recombinant p60 antigen of *L. monocytogenes*. Purified recombinant p60 protein was used for immunization of BALB/c mice. Immune splenocytes were fused with X63-Ag 8.6.5.3 myeloma cells using PEG-1500. Hybridomas were screened by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Following five independent hybridizations, 149 of 1,386 hybridomas showed primary specific reactivity to recombinant p60. Multi-stage screening resulted in the selection of seven stable hybridoma clones producing specific monoclonal antibodies. Antibodies produced by clones 1H8 and 2A3 exhibited the highest activity, with titers of 1:256 in culture supernatants and 1:204,800 in ascitic fluid. No cross-reactivity with the tested heterologous recombinant antigens was detected. The obtained monoclonal antibodies represent promising candidates for the further development of immunodiagnostic reagents for the detection of *L. monocytogenes*.

Keywords: listeriosis, *Listeria monocytogenes*, p60, recombinant antigen, monoclonal antibodies, hybridoma, enzyme-linked immunosorbent assay

Авторлар туралы мәліметтер

Каукабаева Гүлдаригаш — магистр «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, 010000, Қазақстан, Астана қ., Қорғалжын тас жолы, 13/5; e-mail: kaukabaeva@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9052-5091>.

Ескендірова Сәуле — ветеринария ғылымдарының кандидаты, профессор, «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС, 010000, Қазақстан, Астана қ., Қорғалжын тас жолы, 13/5; e-mail: eskendirova@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9570-7433>.

Сведения об авторах

Каукабаева Гулдаригаш — магистр ТОО «Национальный центр биотехнологии» Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Коргалжынское шоссе, 13/5; e-mail: kaukabaeva@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9052-5091>.

Ескендинова Сауле — кандидат ветеринарных наук, профессор, ТОО «Национальный центр биотехнологии» Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Коргалжынское шоссе, 13/5; e-mail: eskendirova@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9570-7433>

Information about the authors

Kaukabayeva Guldarigash - master, LLP «National Center for Biotechnology», Republic of Kazakhstan. 010000, Astana, Korgalzhyn Highway 13/5; e-mail: kaukabaeva@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9052-5091>

Eskendirova Saule - Candidate of Veterinary Sciences, Professor, LLP «National Center for Biotechnology», Republic of Kazakhstan. 010000, Astana, Korgalzhyn Highway 13/5, e-mail: eskendirova@biocenter.kz. <https://orcid.org/0000-0002-9570-7433>

Поступила в редакцию 03.09.2026

Поступила после доработки 21.09.2026

Принята к публикации 29.09.2026

DOI:

MPHTI: 68.41.55

Л.Т. Аутелеева*

НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина»,
010011, Республика Казахстан, г. Астана, пр. Женис, 62

*e-mail: auteleeva@kazatu.edu.kz

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ КОНИНЫ ПРИ ПАРАСКАРИДОЗЕ: СРАВНЕНИЕ ТЕРРИТОРИЙ С РАЗЛИЧНЫМ РАДИАЦИОННЫМ РИСКОМ ВБЛИЗИ БЫВШЕГО СЕМИПАЛАТИНСКОГО ЯДЕРНОГО ИСПЫТАТЕЛЬНОГО ПОЛИГОНА

*Аннотация: Сочетание пастбищного содержания лошадей и неоднородной радиоэкологической обстановки в районах, соседствующих с бывшим Семипалатинским ядерным испытательным полигоном, требует оценки продукции с одновременным учетом паразитарного статуса животных. Цель работы заключалась в выявлении территориальных различий аминокислотного профиля мяса лошадей с инвазией *Parascaris equorum* в четырех категориях радиационного риска и их описательном сопоставлении с радиометрическими характеристиками хозяйств. Материал был получен в 2024-2025 гг. в хозяйствах сел Бодене, Бескарагай, Сагыр и Жанतिकей. Радиометрический блок включал измерение мощности экспозиционной дозы гамма-излучения, плотности потока бета-частиц и эквивалентной равновесной объемной активности радона. Аминокислотный состав определяли в пробах мяса от 40 лошадей с параскаридозом методом жидкостной хроматографии на Shimadzu LC-20 Prominence. Межтерриториальное сравнение выполняли описательно, рассчитывая абсолютные различия и процентное отклонение от принятого уровня сравнения. Измеренные диапазоны составили 0,10-0,32 мкЗв/ч для гамма-излучения, 4,1-8,6 част./(мин·см²) для потока бета-частиц и 66-128 Бк/м³ для радона в помещениях. В Бодене, Бескарагае, Сагыре и Жантикее сумма незаменимых аминокислот достигала 7486, 7682, 7881 и 8081 мг/100 г соответственно. По отношению к уровню сравнения дефицит составлял 8,60; 6,20; 3,77 и 1,33%, причем наибольшие различия приходились на триптофан и метионин. Для совокупности аминокислот показатель дефицита снижался от 8,75% в зоне чрезвычайного риска до 2,43% в зоне минимального риска. Эта последовательность отражает территориальную ассоциацию, но не*