

Изучение диагностической значимости иммунореактивных эпитопов протеаз семейства OmpTn с использованием пептидной библиотеки

В. А. Федорова^{1,2}, М. А. Хижнякова^{1,2}, С. С. Зайцев¹, А. М. Ляпина¹,
Л. В. Саяпина³, Е. П. Ляпина⁴, О. В. Ульянова¹, В. Л. Мотин⁵

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, филиал в г. Саратове,
Саратов, Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, д. 6.

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова»,
410012, Российская Федерация, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

⁵ Университет Техаса, факультет медицины,
77555, США, Техас, г. Галвестон, Университетский бульвар, д. 301

Поступила 03.07.2017 г. Принята к публикации 04.07.2017 г.

Конструирование высокочувствительных диагностических тест-систем нового поколения требует использования современных инновационных технологий, позволяющих выявлять возбудителей инфекционных заболеваний на молекулярном уровне путем выявления специфических антител к индивидуальным иммунореактивным эпитопам. Разработка таких иммуногестов основана на молекулярном картировании таргетного антигена с применением библиотеки коротких перекрывающихся пептидов, направленных на идентификацию антигенной детерминанты как специфической для конкретного патогена, так и эпитопов, общих для группы возбудителей инфекционных заболеваний. В статье изложены новые подходы к совершенствованию ретроспективной лабораторной диагностики инфекционных болезней, вызываемых бактериями семейства Enterobacteriaceae, основанные на результатах картирования модельного белка группы OmpTn. Обсуждаются перспективы апробации экспериментального варианта пептидного твердофазного иммуноферментного анализа, обозначенного как р6/24-OmpTn-ТИФА, для выявления антител к диагностически значимым эпитопам OmpTn, в сыворотках крови людей, переболевших энтеробактериальными инфекциями, с целью дальнейшего внедрения в практическое здравоохранение.

Ключевые слова: лабораторная диагностика; пептидный эррей; твердофазный иммуноферментный анализ; OmpTn; Enterobacteriaceae; ретроспективная диагностика; иммунореактивный эпитоп.

Библиографическое описание: Федорова ВА, Хижнякова МА, Зайцев СС, Ляпина АМ, Саяпина ЛВ, Ляпина ЕП, Ульянова ОВ, Мотин ВЛ. Изучение диагностической значимости иммунореактивных эпитопов протеаз семейства OmpTn с использованием пептидной библиотеки. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2017; 17(3): 180–186.

Согласно статистическим данным, ежегодно в Российской Федерации регистрируется от 40 до 60 миллионов случаев инфекционных болезней, вызываемых представителями семейства Enterobacteriaceae, с тенденцией к устойчивому росту количества групповых заболеваний дизентерией и другими кишечными инфекциями [1]. По данным Роспотребнадзора в 2016 году сальмонеллезные инфекции выросли на 14,7 % и составили 12,97 на 100 тыс. населения против 11,31 за тот же период 2015 года [2].

Известно, что эффективный контроль за распространением инфекционных заболеваний во многом зависит от доступности современных мультиплексных тестов, позволяющих осуществлять диагностические мероприятия, в том числе и ретроспективно. В то же время совершенствование лабораторной диагностики бактериальных инфек-

ций во многом определяется использованием для конструирования диагностических тест-систем нового поколения высокоточных технологий в сочетании с применением индивидуальных молекулярных мишеней детектируемых патогенов.

Для выявления последних в настоящее время широко распространена технология пептидного ELISA (от англ. Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) или пептидного твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) с использованием сывороточных антител реконвалесцентов или привитых людей для оценки иммунного статуса. Выяснено, что такой подход с помощью панели иммунных сывороток позволяет прояснить специфичность тестируемых антител на молекулярном уровне, т.е. фактически картировать таргетный (гомологичный) антиген на уровне от-

дельного эпитопа, с выявлением антигенной детерминанты распознаваемой специфичности. Наиболее распространенным и оптимальным для реализации указанной цели считается использование библиотеки коротких перекрывающихся пептидов, способных специфически «узнавать» индивидуальные эпитопы белковых антигенов возбудителей инфекционных заболеваний, обеспечивая тем самым высокую точность диагностики на молекулярном уровне [3].

Белки внешней мембраны, представляющие собой интегральные мембранные протеазы семейства OmpT, известные как OmpT_{in}, являются признанными ключевыми факторами вирулентности для различных грамотрицательных патогенов, включая бактерии семейства Enterobacteriaceae [4]. Локализация на внешней мембране бактериальных клеток во многом определяет их выраженные антигенные свойства и важную роль во взаимодействии микро- и макроорганизма. Доказана иммуномодулирующая активность белков OmpT_{in} и непосредственное участие в иммуно- и патогенезе соответствующих инфекционных заболеваний [5–7]. Одним из наиболее изученных представителей семейства OmpT_{in} считают активатор плазминогена (Pla) *Yersinia pestis* [8–11]. Ранее было показано, что белки этой группы принимают участие в формировании иммунного ответа к Pla с выработкой гомологичных антител у лабораторных моделей и людей [12, 13]. Применение панели моноклональных антител позволило детектировать у данного представителя белков OmpT_{in} эпитопы как специфические для гомологичного возбудителя, так и общие для семейства Enterobacteriaceae [14]. Очевидно, что последние могут иметь важное значение в ретроспективной диагностике инфекционных заболеваний, вызванных энтеробактериями. Вместе с тем конструирование современных высокочувствительных диагностических тестов невозможно без картирования Pla и определения на молекуле данного антигена конкретных иммунореактивных эпитопов.

Целью исследования было выявление иммунореактивных пептидов Pla в сыворотках крови людей, переболевших энтеробактериальными инфекциями, с использованием библиотеки перекрывающихся пептидов и определение их диагностической значимости.

В задачи исследования входило проведение исследований по выявлению диагностически значимых иммунореактивных пептидов у модельного белка группы OmpT_{in} с последующим конструированием экспериментального варианта ТИФА и предварительной оценкой перспектив дальнейших испытаний разрабатываемого пилотного варианта данной модификации иммуноанализа для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными возбудителями.

Материалы и методы

В исследовании использовали сыворотки крови людей ($n = 12$), переболевших ранее (от 3 до 30 лет назад) энтеробактериальными инфекциями (рандомизированная выборка без учета конкретных нозологий). Эти сыворотки крови содержали, по данным предварительных исследований, детектируемый уровень антител к рекомбинантному препарату Pla, очищенному с применением аффинной хроматографии после клонирования в *Escherichia coli* в

виде «фьюжн»/fusion пептида, меченного шестью последовательно расположенными остатками гистидина, известного как His-Tag (от англ. Histidine-Tag) [15, 16].

Определение иммунореактивных пептидов проводили с применением библиотеки перекрывающихся 59 синтетических пептидов (GenScript, США), подготовленной в соответствии с данными генного банка о последовательности гена, кодирующего Pla [17]. Размер каждого пептида составлял 15 а.к. с перекрыванием в 10 а.к. с соседним пептидом, с условным обозначением индивидуальных пептидов арабскими цифрами от 1 до 59 (p1–p59 соответственно). Гарантированная степень очистки пептидов – не менее 95 %. Все исследуемые сыворотки были зашифрованы и обозначены номерами 1–12. Анализ выполняли методом ТИФА с использованием 96-луночных планшетов с повышенной сорбционной емкостью («Thermo Scientific», США) в трех повторностях, согласно рекомендациям [3, 18]. Проявление специфических иммунных комплексов вели с применением конъюгата F(ab')₂-фрагментов козьих антител против иммуноглобулинов человека с пероксидазой хрена («Sigma», США). Реакцию визуализировали 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate (TMB) («Sigma», США). В качестве отрицательного контроля использовали лунки планшета без внесения пептидов. Учет результата проводили при длине волны 450 нм с отсекающим фильтром 630 нм. Положительным считали результат в том случае, когда показатели оптической плотности (ОП) экспериментальной лунки превышали в 2 раза показатели ОП отрицательного контроля.

Выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, кластеризацию и филогенетический анализ проводили в программах ClustalW Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) и MEGA версия 6.0 [19], соответственно, форматах UMPGA. Статистическая обработка результатов выполнена с применением программы GraphPad Prism, версия 6.01.

Результаты и обсуждение

Ранее нами показано, что в основе пептидного ТИФА, известного как модификация пептидного эррея, лежит тот же принцип специфического взаимодействия антиген-антитела, что и в традиционном варианте анализа [3, 20]. В настоящем исследовании схема постановки включала сенсibilизацию отдельных пептидов на твердой фазе с последующей блокировкой свободных сайтов, инкубацией с тестируемыми сыворотками и визуализацией образовавшихся специфических иммунных комплексов. Отличительной особенностью по сравнению с классическим способом (рис. 1, а) явилось проведение сенсibilизации путем последовательного внесения пептидов в отдельные лунки планшета, что обеспечивало возможность взаимодействия сывороточных антител с каждым иммунореактивным линейным индивидуальным эпитопом молекулы антигена семейства OmpT_{in} (рис. 1, б).

Проведенные исследования с применением панели из 12 сывороток позволили обнаружить на молекуле Pla как иммунореактивные (20,3 %, 95 % доверительный интервал, ДИ = 10,9–32,8), так и полностью ареактивные пептиды (79,7 %, 95 % ДИ = 67,2–89,0), которые не реагировали ни с одной из тестируемых сывороток (рис. 2). При этом

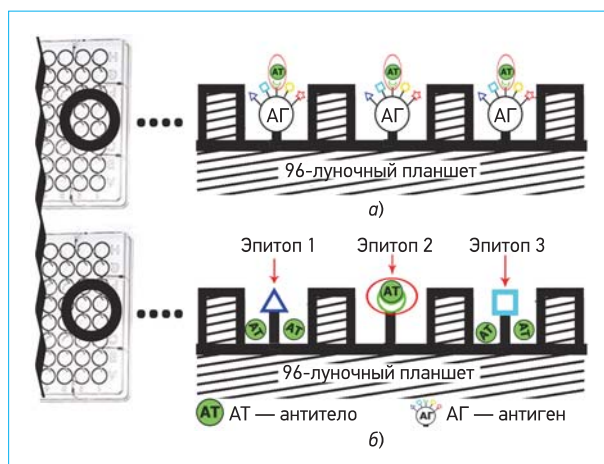


Рис. 1. Схема постановки ТИФА с сенсбилизацией твердой фазы рекомбинантным антигеном Pla (а) и индивидуальными пептидами (б).



Рис. 2. Соотношение иммунореактивных и ареактивных линейных пептидов модельного антигена Pla – представителя Omptin, по данным пептидного ТИФА. Достоверные различия между указанными группами пептидов определяли путем подсчета 95 % ДИ.

полностью ареактивных пептидов оказалось значительно меньше ($p < 0,05$).

По количеству позитивных реакций с тестируемыми сыворотками иммунореактивные пептиды были условно разделены на 4 группы: № 1 – детектировались всеми сыворотками, № 2 – взаимодействовали с более чем 60 % исследуемых образцов, № 3 и 4 обеспечивали позитивные реакции с сывороточными антителами относительно небольшого количества сывороток – от 8 до 50 %. Важно,

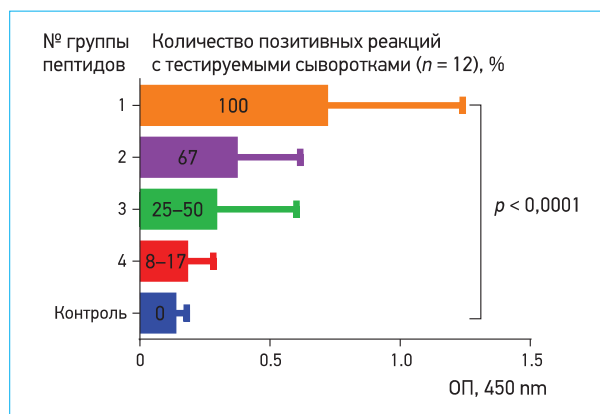


Рис. 3. Сравнительная оптическая плотность (ОП) в ТИФА между группами пептидов (пронумерованы арабскими цифрами 1–4), позитивно реагирующих с 8–17 %, 25–50 %, 67 % и 100 % тестируемых сывороток. Контрольные лунки не содержат антигена. Достоверность определена с применением теста Краскела–Уоллиса.

что наибольшие/максимальные значения ОП регистрировались с пептидами групп № 1 и 2 (рис. 3), что указывает на потенциальную возможность применения их в качестве компонентов диагностических тест-систем.

Действительно, уровень интенсивности ОП позитивных реакций варьировал (рис. 4, а) с превышением значений ОП отрицательного контроля для отдельных иммунореактивных пептидов (Р6, группа 1) в 3,9–15 раз, а для индивидуальных пептидов, реагирующих, по крайней мере, с 25–66 % исследуемых сывороток (Р12, Р24, Р46 и Р55, группы 2–4) – в 2,1–10-кратном диапазоне (рис. 4, б). Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей в области молекулярного картирования антигенов с применением библиотек синтетических пептидов, сообщавших о выраженных различиях в уровне детектируемого цветного сигнала у отдельных доноров [18].

В настоящем исследовании важным следует считать зафиксированный факт принципиальной возможности применения разработанной нами пептидной библиотеки модельного белка семейства Omptin для выявления комплементарных (гомологичных) сывороточных антител у людей, перенесших ранее инфекции, вызванные энтеропатогенными бактериями, аналогично исследованиям, выполненным на других бактериальных моделях [3]. Ана-

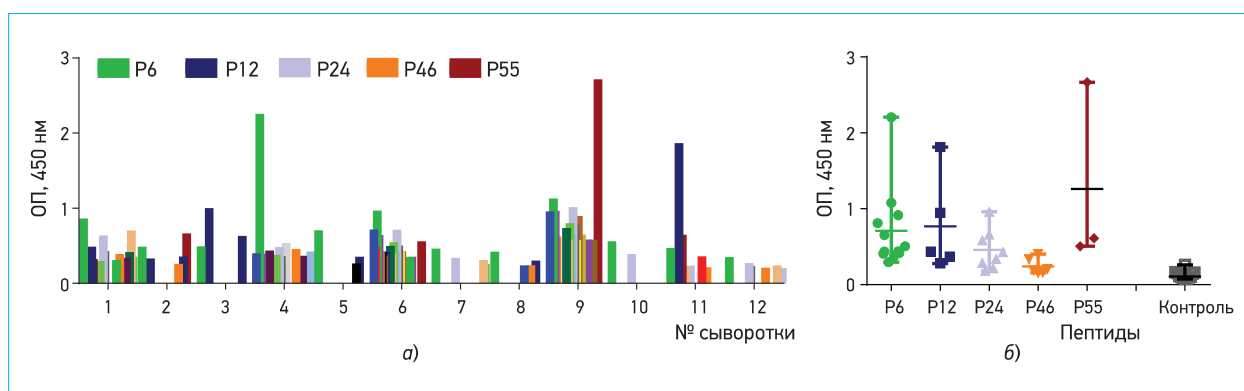


Рис. 4. Определение значений оптической плотности (ОП) в пептидном ТИФА с панелью из 12 зашифрованных сывороток крови волонтеров с анамнестическим серологическим ответом к модельному антигену семейства Omptin и (а) библиотекой синтетических пептидов (бары обозначены разными цветами), (б) включая индивидуальные пептиды (Р6, Р12, Р24, Р46 и Р55), реагирующие с 25–100 % сывороток с максимальным уровнем цветного сигнала ($M \pm m$).

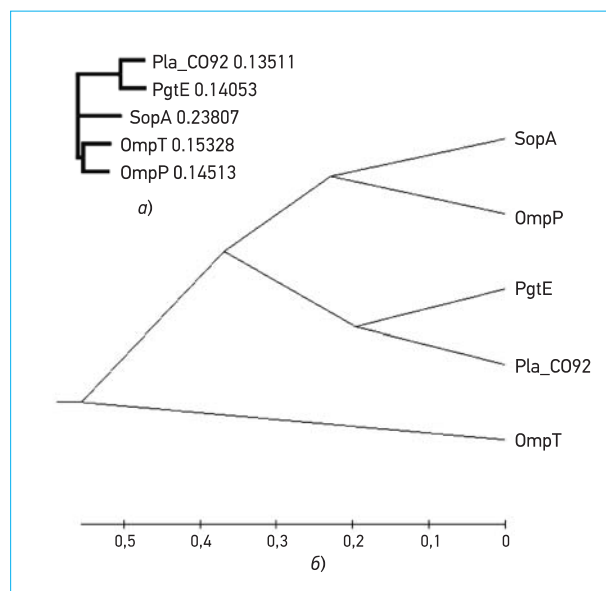


Рис. 5. Кластерный и филогенетический анализ представителей семейства Omptin (Pla, PgtE, SopA, OmpT и OmpP) с применением аминокислотных (а) и нуклеотидных (б) последовательностей в формате UPMGA.

лиз полученных данных позволил обнаружить, по крайней мере, 5 отдельных иммунореактивных пептидов. Однако три пептида (P12, P46 и P55) взаимодействовали только с 42, 50 и 25 % сывороток, и, соответственно, обладали относительно невысокой диагностической значимостью. В то же время два пептида (P6 и P24) обеспечивали более половины положительных реакций со всеми тестируемыми сыворотками и, по-видимому, являлись группоспецифическими. На наш взгляд, применение данных антигенов в качестве сенситива указывает на возможность разработки на их основе экспериментального варианта пептидного ТИФА, обозначенного нами как Р6/24-Omptin-ТИФА, для ретроспективной диагностики инфекционных болезней.

Проверка генетической детерминированности иммуносерологического родства путем сравнительного анализа белковой последовательности молекулы Pla с другими протеазами семейства Omptin подтвердила их высокую гомологию [11]. Как видно на рисунке 5, а, линейные пептидные последовательности Pla и PgtE (*Salmonella enterica*) формировали единый кластер и обладали невысоким уровнем дискриминации от трех других представителей семейства Omptin: SopA (*Shigella flexneri*), OmpT и OmpP (*E. coli*). Более того, филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей каждого из соответствующих антигенов также указывал на их близкое филогенетическое родство, потенциальное наличие общего предка, относительно низкую степень дифференциации друг от друга (рис. 5, б), что объясняет наличие у белков Omptin группоспецифических антигенных детерминант, имеющих потенциально диагностическое значение. Очевидно, особую важность это может иметь при конструировании мультиплексных тест-систем нового поколения для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными возбудителями, особенно таких актуальных инфекций, как сальмонеллез, иерсиниозы, шигеллез и эшерихиозы [1, 2].

Кроме того, несомненным преимуществом является возможность проведения иммуносерологической диагностики не одного, а группы инфекционных заболеваний, вызванных представителями семейства Enterobacteriaceae, поскольку основу экспериментального пептидного ТИФА составили группоспецифические пептиды группы Omptin [4–7]. Однако для всесторонней оценки диагностической значимости сывороточных антител к группоспецифическим эпитопам Omptin, а также основных характеристик разрабатываемой тест-системы, требуются дальнейшие медицинские исследования экспериментального варианта Р6/24-Omptin-ТИФА с применением расширенной панели сывороток крови людей, переболевшими ранее энтеробактериальными заболеваниями, с последующим внедрением нового диагностического теста в практическое здравоохранение.

Выводы

1. Проведенные исследования зашифрованных сывороток крови людей, переболевших ранее энтеробактериальными инфекционными заболеваниями, позволили выявить диагностически значимые иммунореактивные пептиды (Р6 и Р24) у модельного белка Pla, обладающие высокой гомологией с другими антигенами группы Omptin представителей семейства Enterobacteriaceae.

2. Показано, что разработанный экспериментальный вариант ТИФА – модификация пептидного ELISA на основе двух маркерных пептидов Omptin (Р6 и Р24), может быть использован для ретроспективной диагностики инфекционных заболеваний, вызванных энтеропатогенными бактериальными агентами.

3. Определена перспектива дальнейших исследований с проведением медицинских испытаний экспериментального варианта Р6/24-Omptin-ТИФА на расширенной панели сывороток крови людей, переболевших инфекционными заболеваниями, вызванными энтеропатогенными бактериями, для последующего внедрения нового диагностического теста в практическое здравоохранение.

Работа выполнена в рамках реализации Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы, а также при частичной поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-34-00051 программа «мол_а».

Литература

1. Забонрицкий НА. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации и тенденции ее развития в ближайшее десятилетие. Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. 2015; 17(5): 16–26.
2. Роспотребнадзор обнаружил статистику инфекционных болезней за первое полугодие. Available from: <http://www.yaprivat.ru/news/2365/>.
3. Reineke U, Schutkowski M, eds. Methods of Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols. Vol. 524. New York: Humana Press; 2009.
4. Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. Mol Membr Biol. 2007; 24(5 – 6): 395–406.
5. Kukkonen M, Korhonen TK. The Omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in Escherichia

- coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(1): 7–14.
6. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, L hteenm ki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers – attack on innate immune defences by OmpT surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun*. 2009; 15(2): 67–80.
 7. Brannon JR, Thomassin JL, Gruenheid S, Le Moual H. Antimicrobial peptide conformation as a structural determinant of OmpT protease specificity. *J Bacteriol*. 2015; 197(22): 3583–91.
 8. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992; 258(5084): 1004–7.
 9. Куклева ЛМ, Бойко АВ. Активатор плазминогена – многофункциональный белок возбудителя чумы. *Проблемы особо опасных инфекций* 2016; 3: 13–20.
 10. Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westermund-Wikström B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 35.
 11. Есеева ВВ, Платонов МЕ, Копылов ПХ, Денцовская СВ, Анисимов АП. Активатор плазминогена чумного микроба. *Инфекция и иммунитет* 2015; 5(1): 27–36.
 12. Easterbrook TJ, Reddin K, Robinson A, Modi N. Studies on the immunogenicity of the Pla protein from *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995; 13: 214–5.
 13. Benner GE, Andrews GP, Byrne WR, Strachan SD, Sample AK, Heath DG, et al. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(4): 1922–8.
 14. Feodorova VA, Devdariani ZL. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J Med Microbiol*. 2000; 49(3): 261–9.
 15. Braciale VL, Nash M, Sinha N, Zudina IV, Motin VL. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. In: Georgiev VS, Western K, McGowan JJ, eds. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Volume 1: Frontiers in Research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. P. 473–80.
 16. Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Lyapina AM, Zaitsev SS, Telepnev MV, Sayapina LV, et al. Murine and human early humoral immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen followed by immunization with live plague vaccine: Proceeding Book of the 12th International *Yersinia* Symposium. 2016, Oct. 25–28; Tbilisi; Georgia. P. 38.
 17. *Yersinia pestis* CO92 plasmid pPCP1, complete sequence. NCBI Reference Sequence: NC 003132.1. Available from: <https://goo.gl/26Ag6J>.
 18. Heuzenroeder MW, Barton MD, Vanniasinkam T, Phumoonna T. Linear B-cell epitope mapping using enzyme-linked immunosorbent assay for libraries of overlapping synthetic peptides. *Methods Mol Biol*. 2009; 524: 137–44.
 19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(12): 2725–9.
 20. Хижнякова МА, Федорова ВА, Зайцев СС, Мотин ВЛ. Применение пептидных микрочипов для эпигеномного картирования и иммунодиагностики инфекционных заболеваний. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета* 2013; 1(39): 228–30.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии, филиал в г. Саратове, Саратов, Российская Федерация, 410028, Саратов, ул. 53-й Стрелковой Дивизии, д. 6.
Федорова Валентина Анатольевна. Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, д-р мед. наук, профессор.

Хижнякова Мария Александровна. Младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Зайцев Сергей Сергеевич. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Ляпина Анна Михайловна. Научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий.

Ульянова Онега Владимировна. Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и нанобиотехнологий, канд. мед. наук, доцент.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова», 410012, Российская Федерация, г. Саратов, Театральная площадь, д. 1.

Федорова Валентина Анатольевна. Профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, д-р мед. наук, профессор.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Российская Федерация, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2.

Саяпина Лидия Васильевна. Главный эксперт управления экспертизы противобактериальных медицинских иммунобиологических препаратов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов, д-р мед. наук.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 410012, Российская Федерация, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112.

Ляпина Елена Павловна. Профессор кафедры инфекционных болезней, д-р мед. наук.

Университет Техаса, Факультет Медицины, 77555, США, Техас, г. Галвестон, Университетский бульвар, д. 301

Мотин Владимир Леонидович. Профессор университета, Департамент патологии, Департамент микробиологии и иммунологии, канд. биол. наук.

Адрес для переписки: Федорова Валентина Анатольевна; feodorovav@mail.ru

Evaluation of diagnostic potential of immunoreactive epitopes of the Omptin protease family by using a peptide library

V. A. Feodorova^{1,2}, M. A. Khizhnyakova^{1,2}, S. S. Zaitsev¹, A. M. Lyapina¹,
L. V. Sayapina³, E. P. Lyapina⁴, O. V. Ulyanova¹, V. L. Motin⁵

¹ Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCVM) — Branch in Saratov,
53rd Strelkovoy Divizii street 6, Saratov 410028, Russian Federation

² Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education
«Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov»,
Teatralnaya Square 1, Saratov 410012, Russian Federation

³ Federal State Budgetary Institution
«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation

⁴ Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education
«Saratov State Medical University named after N. I. Razumovsky»
of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Bolshaya Kazachya street 112, Saratov 410012, Russian Federation

⁵ University of Texas Medical Branch,
301 University Boulevard, Galveston, Texas 77555, USA

The construction of highly sensitive new-generation diagnostic test systems requires the use of modern innovative technologies that are capable of detecting infectious agents at the molecular level by identifying specific antibodies to individual immunoreactive epitopes. The development of such immunoassays is based on molecular mapping of a target antigen using a library of short overlapping peptides aimed at identification of both epitopes specific for a particular pathogen, and those common to the group of infectious agents. The article describes new approaches that are based on the results of mapping of the Omptin group model protein that could be critical for improving retrospective laboratory diagnosis of infectious diseases caused by bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. The article discusses the prospects for assessing the applicability of the peptide ELISA experimental version, designated as p6/24-Omptin-TIFA, for the detection of antibodies to diagnostically significant Omptin epitopes in the serum of people who have had enterobacterial infections, in order to introduce it into healthcare practices.

Key words: laboratory diagnosis; peptide array; ELISA; Omptin; Enterobacteriaceae; retrospective diagnosis; immunoreactive epitope.

For citation: Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Zaitsev SS, Lyapina AM, Sayapina LV, Lyapina EP, Ulyanova OV, Motin VL. Evaluation of diagnostic potential of immunoreactive epitopes of the Omptin protease family by using a peptide library. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2017; 17(3): 180–186.

References

1. Zabokritskiy NA. The infectious morbidity in the Russian Federation and tendencies of it is development in the next decade. On-line Scientific & Educational Bulletin «Health and Education Millennium». 2015; 17(5): 16–26 (in Russian).
2. Rospotrebnadzor released statistics of infectious diseases for the first half of the year. Available from: <http://www.yaprivot.ru/news/2365/>.
3. Reineke U, Schutkowski M, eds. *Methods of Molecular Biology, Epitope Mapping Protocols*. Vol. 524. New York: Humana Press; 2009.
4. Hritonenko V, Stathopoulos C. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae. *Mol Membr Biol*. 2007; 24(5–6): 395–406.
5. Kukkonen M, Korhonen TK. The Omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int J Med Microbiol*. 2004; 294(1): 7–14.
6. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers – attack on innate immune defences by Omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun*. 2009; 15(2): 67–80.
7. Brannon JR, Thomassin JL, Gruenheid S, Le Moual H. Antimicrobial peptide conformation as a structural determinant of Omptin protease specificity. *J Bacteriol*. 2015; 197(22): 3583–91.
8. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 1992; 258(5084): 1004–7.
9. Kukleva LM, Boiko AV. Plasminogen activator — multifunctional protein of plague pathogen. *Problems of Particularly Dangerous Infections* 2016; 3: 13–20 (in Russian).
10. Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Järvinen HM, Westerlund-Wikström B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 35.
11. Evseeva VV, Platonov ME, Kopylov PKH, Dentovskaya SV, Anisimov AP. Plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *Russian Journal of Infection and Immunity* 2015; 5(1): 27–36 (in Russian).
12. Easterbrook TJ, Reddin K, Robinson A, Modi N. Studies on the immunogenicity of the Pla protein from *Yersinia pestis*. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995; 13: 214–5.
13. Benner GE, Andrews GP, Byrne WR, Strachan SD, Sample AK, Heath DG, et al. Immune response to *Yersinia* outer proteins and other *Yersinia pestis* antigens after experimental plague infection in mice. *Infect Immun*. 1999; 67(4): 1922–8.
14. Feodorova VA, Devdariani ZL. Development, characterisation and diagnostic application of monoclonal antibodies against *Yersinia pestis* fibrinolysin and coagulase. *J Med Microbiol*. 2000; 49(3): 261–9.
15. Braciale VL, Nash M, Sinha N, Zudina IV, Motin VL. Correlates of immunity elicited by live *Yersinia pestis* vaccine. In: Georgiev VS, Western K, McGowan JJ, eds. *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. Volume 1: Frontiers in Research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. P. 473–80.
16. Feodorova VA, Khizhnyakova MA, Lyapina AM, Zaitsev SS, Telepnev MV, Sayapina LV, et al. Murine and human early humoral immune responses to *Yersinia pestis* Pla antigen followed by immunization with live plague vaccine: Proceeding Book of the 12th International *Yersinia* Symposium. 2016, Oct. 25–28; Tbilisi; Georgia. P. 38.
17. *Yersinia pestis* CO92 plasmid pPCP1, complete sequence. NCBI Reference Sequence: NC_003132.1. Available from: <https://goo.gl/26Ag6J>.
18. Heuzenroeder MW, Barton MD, Vanniasinkam T, Phumoonna T. Linear B-cell epitope mapping using enzyme-linked immunosorbent

- assay for libraries of overlapping synthetic peptides. *Methods Mol Biol.* 2009; 524: 137–44.
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.* *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725–9.
20. Khizhnyakova MA, Feodorova VA, Zaitsev SS, Motin VL. *The use of peptide microchips for epitope carting and immuno-diagnostics of infectious diseases.* *Izvestia Orenburg State Agrarian University* 2013; 1 (39): 228–30 (in Russian).

Authors

Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCVM) — Branch in Saratov, 53rd Strelkovoy Divizii street 6, Saratov 410028, Russian Federation.

Feodorova VA. Chief research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies. Doctor of Medical Sciences, professor. *Khizhnyakova MA.* Junior research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Zaitsev SS. Research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Lyapina AM. Research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies.

Ulyanova OV. Senior research associate of the Laboratory of Molecular Biology and Nanobiotechnologies. Candidate of Medical Sciences, assistant professor.

Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education

«Saratov State Agrarian University named after N. I. Vavilov», Teatralnaya Square 1, Saratov 410012, Russian Federation.

Feodorova VA. Professor of the Department of Microbiology, Biotechnology and Chemistry. Doctor of Medical Sciences, professor.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Sayapina LV. Chief expert. Doctor of Medical Sciences.

Federal State-Funded Institution of Higher Professional Education «Saratov State Medical University named after N. I. Razumovsky» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Bolshaya Kazachya street 112, Saratov 410012, Russian Federation.

Lyapina EP. Professor of the Department of Infectious Diseases. Doctor of Medical Sciences.

University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, Texas 77555, USA

Motin VL. Professor of the Department of Pathological Conditions and the Department of Microbiology and Immunology. Candidate of Biological Sciences.

Contact e-mail: Feodorova Valentina Anatolyevna; feodorovav@mail.ru