

УДК 616.981.452:001.5

**З.Л.Девдариани, Н.Е.Терешкина, Т.М.Тараненко, М.Н.Киреев, И.В.Терехова, Г.В.Григорьева,  
М.Н.Исляева, Н.М.Ермаков, Н.А.Виноградова, А.Н.Малахаева**

### **РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО КОНСТРУИРОВАНИЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К Ф1 ЧУМНОГО МИКРОБА (ИФА-АТ-Ф1 *YERSINIA PESTIS*)**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Разработана иммуноферментная тест-система для выявления антител к капсульному антигену Ф1 чумного микроба «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*». В модельных экспериментах на лабораторных мышах показано, что данная тест-система высокоспецифична, диагностический титр составляет 1/320. Диагностическая ценность тест-системы при исследовании образцов сывороток и суспензий крови, смывов с органов грудной полости животных, обработанных живой чумной вакциной, штаммами чумного микроба, содержащими и не содержащими pFra, а также гетерологичными бактериями, составила 83,3–88,9 %.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, капсульный антиген Ф1, антитела, диагностическая тест-система, иммуноферментный анализ.

**Z.L.Devdariani, N.E.Tereshkina, T.M.Taranenko, M.N.Kireev, I.V.Terekhova, G.V.Grigor'eva, M.N.Islyaeva,  
N.M.Ermakov, N.A.Vinogradova, A.N.Malakhayeva**

### **Results of Modeling Experiments in Designing Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of Antibodies to *Yersinia pestis* F1 (ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*)**

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Designed is immuno-enzyme test-system for the detection of antibodies to *Yersinia pestis* capsular antigen F1 – “ELISA-Ab-F1 *Yersinia pestis*”. On the model of laboratory mice it is demonstrated that this test-system is highly specific, its diagnostic titer being 1/320. Diagnostic value of the test-system is 83.3–88.9 % as revealed through investigations of sera and blood suspension samples, swabs of thoracic organs of animals, inoculated with live plague vaccine, strains of plague microbe, containing and deprived of pFra, as well as with heterologous bacteria.

*Key words:* *Yersinia pestis*, capsular antigen F1, antibodies, diagnostic test-system, enzyme-linked immuno-assay.

Целесообразность проведения в природных очагах чумы профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возможных эпидемических осложнений, во многом определяется эффективностью эпизоотологического обследования энзоотических территорий [4, 5]. При эпизоотологическом мониторинге используется целый комплекс методов, среди которых весьма информативными являются серологические исследования антителосодержащих жидкостей (АСЖ) животных-носителей чумной инфекции, в основном представителей отряда *Rodentia*, с целью обнаружения антител к видоспецифическим антигенам *Yersinia pestis*, в частности, капсульному антигену – фракции 1 (Ф1) [4].

В Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные диагностические препараты для определения антител к *Y. pestis* [4]. Поэтому актуальной задачей является конструирование и внедрение в практику тест-систем соответствующего назначения, в частности, на основе иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющего, по литературным данным, эффективно обнаруживать антикапсульные антитела [3, 8].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования явилась разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к Ф1 чумного микроба.

### **Материалы и методы**

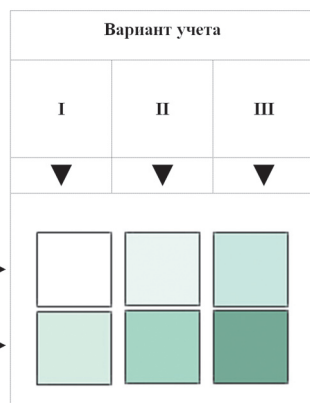
В сконструированной тест-системе был реализован непрямой вариант ИФА. Твердой фазой служили полистироловые планшеты отечественного производства (Медполимер, Россия). В качестве сенситина использовали препарат Ф1 *Y. pestis*, выделенный по методу Л.Н. Сердобинцева и соавт. [7], в концентрации 20 мкг/мл. Свободные сайты на пластике блокировали 0,5 % раствором молока обезжиренного сухого. Вышеописанную предварительную обработку планшетов проводили непосредственно перед тестированием АСЖ, а также за 1, 3 и 6 мес. до постановки ИФА.

В качестве конъюгата применяли белок А (Имтек, Россия), меченный пероксидазой хрена (Диаэм, Россия) [2], в рабочем разведении. Хромогенным субстратом служил 2,2'-азино-бис-(3-ethylbenzthia-

При визуальном учете реакции следует принимать во внимание, что раствор в лунках с отрицательным контролем может быть бесцветным или слабоокрашенным. Выбор варианта учета реакции определяется цветом раствора в отрицательном контроле

Окрашивание раствора в лунке с отрицательным контролем

Наименее интенсивное окрашивание раствора в лунке с образцом, соответствующее положительному результату



Цветовая шкала для визуального учета результатов при использовании «Тест-системы иммуноферментной для выявления антител к чумному микробу (ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*)»

zoline-6-sulfonic acid), diammonium salt (ABTS) (Sigma, США). Результаты учитывали визуально, используя специально разработанную цветовую шкалу (рисунок), и спектрофотометрически на автоматическом микропланшетном фотометре «Multiskan EX» (Китай) при длине волны 405 нм, принимая за положительный результат значение оптической плотности, не менее чем в 3 раза превышающее таковое в отрицательном контроле.

Материалом для исследования служили сыворотки и суспензии крови, а также смывы с органов грудной полости (СОГП) мышей инбредной линии BALB/c. Для имитации инфекционного процесса и индукции антительного ответа 8–12-недельных животных массой 18–20 г однократно вакцинировали живой чумной вакциной из штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ (ЖЧВ, Ставрополь) в дозе от  $5 \cdot 10^5$  до  $8 \cdot 10^5$  м.к./мышь или иммунизировали убитыми микробными клетками в той же дозе с полным адьювантом Фрейнда в соотношении 1/1. Контрольной группе интактных мышей вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Образцы АСЖ обеззараживали в соответствии с СП 1.3.1285-03 [1]. Кроме того, тестировали образцы суспензии крови, нанесенные на фильтровальную бумагу, пропитанную натрием мертиолатом (КФБ-М) [1]. Каждый образец последовательно двукратно титровали в объеме 100 мкл с разведения 1:40.

Положительным контрольным образцом (ПКО-Ф1) служили иммуноглобулины мышей той же линии, иммунизированных 5-кратно внутрибрюшинно с 2-недельным интервалом препаратом антигена Ф1 чумного микроба в дозе 50–100 мкг. В отрицательный контроль вносили фосфатно-солевой буферный раствор.

Высушивание пероксидазного конъюгата белка А и ПКО-Ф1 осуществляли с использованием центрифуги-концентратора CentriVar 7310030 (Lab-conco, США) при температуре 4 °С, скорости вращения ротора 1425 об/мин и давлении  $1 \cdot 10^{-4}$  торр. Активность препаратов после высушивания определяли в не прямом ИФА.

## Результаты и обсуждение

При разработке тест-системы «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» принципиальным вопросом был выбор конъюгата – компонента реакции, обеспечивающего обнаружение специфического комплекса антиген–антитело [2, 3]. Наиболее приемлемым реагентом для данной тест-системы, с нашей точки зрения, оказался стафилококковый белок А, меченный пероксидазой, который, как сообщалось ранее, эффективен для выявления противочумных антител [3]. Применение данного конъюгата позволит использовать тест-систему при исследовании сывороток носителей чумы независимо от их видовой принадлежности, так как известным свойством белка А является его способность связываться с иммуноглобулинами класса G животных разных видов [3]. Было получено 3 серии конъюгата с активностью 1:1000, которая сразу после высушивания и хранения в течение срока наблюдения (6 мес.) оставалась на одном уровне.

Были проведены две серии модельных экспериментов по применению тест-системы «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*». В рамках I серии исследовали образцы суспензии крови мышей, взятые на 7-й, 14-й и 21-й день после вакцинации или иммунизации, с целью определения сроков появления и динамики нарастания специфических антител. При исследовании образцов крови мышей, вакцинированных ЖЧВ, было установлено, что на 7-й день у отдельных особей обнаруживались антикапсульные антитела (анти-Ф1-Ат) в титре 1/80–1/160, тогда как у большинства мышей регистрировались титры не выше 1/40. К 14-му дню более 80 % вакцинированных животных демонстрировали титры антикапсульных антител в интервале от 1/80 до 1/1280. На 21-й день отмечалось увеличение значений специфического титра, который колебался от 1/320 до 1/5120, что коррелировало с закономерностями динамики формирования антительного ответа у животных [6]. Таким образом, максимальная диагностическая ценность тест-системы, которую выражают в процентах правильно определенных образцов, содержащих анти-Ф1-Ат, к общему числу исследованных проб, содержащих соответствующие антитела, была отмечена на 21-й день эксперимента, составив в среднем 83,3–88,9 % при визуальном и 83,3 % при инструментальном учете.

В образцах крови мышей, иммунизированных бескапсульными штаммами чумного микроба, гетерологичными микроорганизмами, и интактных максимальный фоновый титр антител к 21-му дню составил 1/160, в связи с чем диагностическим титром тест-системы было принято считать 1/320.

С учетом полученных данных была проведена 2-я серия экспериментов по расширенному тестированию различных видов АСЖ, полученных после обработки биомоделей большим числом штаммов гомо- и гетерологичных бактерий (таблица). Забор материала производили на 21-й день исследования,

Результаты исследования проб АСЖ лабораторных мышей с применением тест-системы «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*»

Штамм, к которому получена АСЖ	Вид АСЖ	Результат ИФА			
		визуально		инструментально	
		обратный титр Ат min / max**	оценка (+/-)	обратный титр Ат min / max	оценка (+/-)
<i>Y. pestis</i> EV (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	Сыворотка крови	1280 / 2560	+	2560 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> EV (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	СОГП	1280 / 5120	+	1280 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> otten (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	«	1280 / 2560	+	640 / 2560	+
<i>Y. pestis</i> A-1122 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	«	2560 / 5120	+	1280 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> 79035 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	Сыворотка крови	2560 / 5120	+	2560 / 10480	+
<i>Y. pestis</i> C-534 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>-</sup> )	«	1280 / 5120	+	640 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> KM-225 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	«	640 / 1280	+	2560 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> A-1108 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	«	1280 / 5120	+	1280 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> 231 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	Суспензия крови	2560 / 10480	+	5120 / 10480	+
<i>Y. pestis</i> 2377 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>+</sup> )	«	320 / 640	+	160 / 640	-
<i>Y. pestis</i> И-3131 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	«	1280 / 5120	+	1280 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> И-3358 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	«	1280 / 10480	+	2560 / 5120	+
<i>Y. pestis</i> M-570 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	КФБ-М	640 / 2560	+	640 / 2560	+
<i>Y. pestis</i> C-358 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	«	1280 / 2560	+	640 / 2560	+
<i>Y. pestis</i> M-1814 (pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	«	80 / 160	-	40 / 160	-
<i>Y. pestis</i> M-957 (pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	Суспензия крови	80 / 160	-	80 / 160	-
<i>Y. pestis</i> KM-215 (pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> )	КФБ-М	40 / 80	-	40 / 160	-
<i>Y. pestis</i> A-1450 (pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>-</sup> )	СОГП	отр. *** / 40	-	отр. / 40	-
<i>Y. pestis</i> PKR-133 (pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> )	Суспензия крови	40 / 80	-	отр. / 40	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 53 (IV)	СОГП	отр. / 40	-	отр. / 160	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 7 <sub>1</sub> (III)	«	40 / 80	-	40 / 40	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 45(205) (V)	Суспензия крови	отр. / 40	-	отр. / 40	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Ia (I)	«	40 / 160	-	40 / 160	-
<i>Y. enterocolitica</i> 96	КФБ-М	отр. / 80	-	40 / 40	-
<i>Y. enterocolitica</i> 480	Сыворотка крови	40 / 80	-	40 / 160	-
<i>Y. enterocolitica</i> 885	«	отр. / 40	-	отр. / 80	-
<i>F. tularensis</i> O-328 (nearctica)	«	отр. / отр.	-	отр. / отр.	-
<i>F. tularensis</i> M-489 (holarctica)	«	отр. / отр.	-	отр. / отр.	-
<i>F. tularensis</i> M-80 (holarctica)	Суспензия крови	40 / 40	-	40 / 40	-
<i>F. tularensis</i> A-61 (mediasiatica)	«	отр. / 40	-	отр. / отр.	-
<i>F. tularensis</i> 503/840	«	40 / 80	-	40 / 40	-
<i>S. typhimurium</i> 20	«	40 / 160	-	80 / 160	-
<i>E. coli</i> 5198/99	«	отр. / отр.	-	отр. / 40	-
Интактные	Сыворотка крови	отр. / отр.	-	отр. / отр.	-
	Суспензия крови	отр. / 40	-	отр. / отр.	-
	СОГП	отр. / отр.	-	отр. / 40	-

\* Пробы, использованные в I серии экспериментов.

\*\* min / max – минимальное и максимальное значения обратного титра антител (Ат) в каждой группе мышей.

\*\*\* Отрицательный результат с первого разведения (1/40).

когда у мышей обнаруживался максимальный титр антител.

Оказалось, что разработанная тест-система позволяет выявлять антикапсульные антитела у обработанных Fra<sup>+</sup> штаммами чумного микроба животных как вакцинированных, так и иммунизированных в большинстве случаев (86,7%), что соответствует естественной вариабельности антителенного ответа на бактериальный патоген у восприимчивых животных [6]. При этом фоновый титр антител у мышей, которым вводили микробные клетки гетерологичных штаммов бактерий, ни в одном случае не превышал установленного в предварительных опытах диагностического титра. Специфичность тест-системы «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» составила 100%. Достоверность данного показателя гарантировалась

тем, что тестируемый антителосодержащий материал был получен в результате обработки животных известными штаммами бактерий.

Обращало на себя внимание то, что при визуальном и инструментальном учете результатов были получены практически одинаковые данные. В 89,6% случаев различия составляли не более одного разведения. Это является существенным положительным моментом для практического использования тест-системы в полевых условиях.

Результаты исследований проб АСЖ с использованием планшетов, высушенных ПКО-Ф1 и меченого пероксидазой белка А, приготовленных за 1, 3 и 6 мес. до эксперимента, полностью коррелировали с таковыми при проведении анализа на подготовленных ex tempore планшетах. Это указывало на

достаточную стабильность сохранения активности нанесенного на пластик специфического антигена и высушенных реагентов при полугодовом сроке хранения тест-системы.

Таким образом, испытания в модельных экспериментах разработанной тест-системы «ИФА-Ат-Ф1 *Yersinia pestis*» свидетельствуют о перспективности ее использования для получения информации о специфическом антительном ответе грызунов на контакт с чумным микробом. Ее внедрение в практику отечественного здравоохранения будет способствовать эффективному эпизоотологическому мониторингу за природными очагами чумы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
2. Курманова Л.В., Ермолин Г.А., Эткин А.Ф., Цветков В.С. Получение специфических иммуноферментных конъюгатов против иммуноглобулинов классов А, G, М человека. Лаб. дело. 1984; 7:402–6.
3. Методические рекомендации по приготовлению и применению диагностического препарата на основе стафилококкового белка А, меченного пероксидазой хрена, в иммуноферментном анализе при выявлении противочумных антител. Иркутск; 1984. 6 с.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, Шико; 2009. 472 с.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
6. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина; 1983. 368 с.
7. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одно-

этапной гелевой фильтрации. В кн.: Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций. Саратов; 1983. С. 37–41.

8. Butler T. Plague into the 21st century. Clin. Infect. Dis. 2009; 49:736–42.

#### References

1. [Safety of works with microorganisms of the I-II pathogenicity groups. Sanitary-epidemiological regulations SR 1.3.1285-03]. Byul. Norm. Metod. Dok. Gossanepidnadzora. 2003; 3(13):61–144.
2. Kurmanova L.V., Ermolin G.A., Etkin A.F., Tsvetkov V.S. [Obtainment of the specific enzyme-linked immuno-sorbent conjugates against human immunoglobulins of A, G, M classes]. Lab. Delo. 1984; 7:402–6.
3. [Methodological regulations on manufacturing and application of diagnostic staphylococcal protein A-based preparation, which is horseradish peroxidase-labeled, for carrying out ELISA to detect plague antibodies]. Irkutsk; 1984. 6 p.
4. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practical Guidelines]. M.: Meditsina, Shiko; 2009. 472 p.
5. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Pre-Caspian Region, Central Asia, and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.
6. Petrov R.V. [Immunology]. M.: Meditsina; 1983. 368 p.
7. Serdobintsev L.N., Taranenko T.M., Verenkov M.S., Naumov A.V. [Obtainment of capsular antigen using one-stage gel-filtration]. In: [Problems of Prophylaxis of Natural-Focal Infections]. Saratov; 1983. P. 37–41.
8. Butler T. Plague into the 21st century. Clin. Infect. Dis. 2009; 49:736–42.

#### Authors:

Devdariani Z.L., Tereshkina N.E., Taranenko T.M., Kireev M.N., Terekhova I.V., Grigor'eva G.V., Islyayeva M.N., Ermakov N.M., Vinogradova N.A., Malakhaeva A.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е., Тараненко Т.М., Киреев М.Н., Терехова И.В., Григорьева Г.В., Исляева М.Н., Ермаков Н.М., Виноградова Н.А., Малахаева А.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 03.08.12.