

О.А.Носкова¹, Т.Ю.Загоскина¹, Е.Н.Субычева¹, Е.Ю.Марков¹, Ю.О.Попова¹, Л.Г.Гриднева¹,
Е.П.Михайлов²

ПРИМЕНЕНИЕ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА В ПОЛЕВОМ МАТЕРИАЛЕ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Сконструированы тест-системы с применением высокодисперсных золей серебра в качестве маркера специфических антител для детекции антигенов возбудителя чумы методом дот-иммуноанализа. Показана их высокая чувствительность при исследовании типичных штаммов чумного микроба: $\geq 5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл и растворимых антигенов (FI) – $\geq 4,8$ нг/мл; а также высокая специфичность: отсутствие ложноположительных реакций с 5 гетерологичными микроорганизмами. Проведена апробация тест-систем на обнаружение антигенов чумного микроба в полевом материале из Алтайского горного природного очага чумы методом дот-иммуноанализа и сравнение результатов исследований с реакцией пассивной гемагглютинации. Разработанные тест-системы обладают рядом преимуществ по сравнению с рутинными серологическими реакциями и могут с успехом применяться в практическом здравоохранении как в стационарных, так и полевых условиях.

Ключевые слова: чумной микроб, специфические антитела, коллоидное серебро, дот-иммуноанализ.

О.А.Noskova¹, T.Yu.Zagoskina¹, E.N.Subycheva¹, E.Yu.Markov¹, Yu.O.Popova¹, L.G.Gridneva¹, E.P.Mikhailov²

Application of Dot-Immunoassay for Detection of Plague Agent Antigens in the Field Samples

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; ²Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation

Test systems for *Yersinia pestis* antigen detection in dot-immunoassay were constructed using superfine silver sols as a marker of specific antibodies. Demonstrated were their high sensitivity while analyzing typical *Y. pestis* strains ($\geq 5 \cdot 10^4$ CFU/ml) and soluble antigens (FI) – ≥ 4.8 ng/ml and high specificity, confirmed by the absence of false-positive reactions with five heterologous microorganisms. The test-systems were used for *Y. pestis* antigen detection in field material from the territory of the Altai mountain natural plague focus by dot-immunoassay with comparison of the received results in passive hemagglutination reaction. Test-systems possessed a number of advantages as compared to routine serological reactions and could be applied with success by practical public health services both in stationary and field conditions.

Key words: plague agent, specific antibodies, colloid silver, dot-immunoassay.

Возникновение в последнее время угрозы биотерроризма с вероятностью использования возбудителя чумы в качестве биологического оружия определяют необходимость разработки и совершенствования методов индикации чумного микроба [3, 7]. Время выявления возбудителей особо опасных инфекций имеет определяющее значение для эффективного и своевременного проведения комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий. Для обнаружения возбудителя чумы и его антигенов в лабораторной практике имеется достаточный набор методов: бактериологический, биологический, гемагглютинационные (реакция пассивной гемагглютинации, реакция нейтрализации антител), иммунофлуоресцентный, иммуноферментный, иммунохроматографический, цитоиммунофлуорометрический, молекулярно-биологический (полимеразная цепная реакция) [6, 8, 10]. Каждый из этих методов обладает своими достоинствами и недостатками, связанными либо с ограниченной чувствительностью или специфичностью, либо с использованием дорогостоящего оснащения и химреактивов, токсичных компонентов для здоровья оператора и вредных для окружающей среды.

Первичные учреждения здравоохранения не всегда имеют необходимую базу для выполнения

сложных анализов и нуждаются в оснащении надежными, простыми и недорогими бесприборными диагностическими тестами. В последнее время в практической работе находит все более широкое применение дот-иммуноанализ (ДИА) с использованием в качестве маркера специфических антител частиц коллоидных металлов. Известно, что многие из коллоидных металлов являются активными катализаторами и потенциально способны в индикаторных реакциях обеспечить усиление сигнала на 1–3 порядка в сравнении с ферментными маркерами, тем самым значительно повышая чувствительность точечного твердофазного иммунного анализа [1, 2, 5].

Разработка высокочувствительных специфичных диагностикомов с использованием коллоидного серебра позволяет обеспечивать потребность в относительно недорогих препаратах для медицинских и научных целей, а простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов делает перспективным их применение в полевых условиях [1, 11].

Целью работы явилось испытание сконструированных с использованием методологии иммунокаталитического анализа тест-систем для дот-иммуноанализа с применением высокодисперсных золей серебра в качестве маркера специфических антител,

позволяющих проводить скрининг полевого материала на наличие антигенов чумного микроба.

Материалы и методы

Исследован полевой материал, собранный при эпизоотологическом обследовании Алтайского горного природного очага чумы: смывы с органов отловленных мелких млекопитающих (даурской пищухи, длиннохвостого суслика, плоскочерепной полевки, их трупов, погадки хищных птиц). Материал, предположительно содержащий антигены чумного микроба, подвергали обеззараживанию согласно требованиям безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности. В соответствии с Методическими указаниями 3.1.3.2355-08 использовали минимальное разведение исследуемого материала 1:10; меньшие разведения образцов не испытывались в связи с тем, что эритроциты и другие окрашенные субстанции, осаждающиеся на пористой мембране, затрудняют процедуру отмывания подложки и влияют на четкость получаемых результатов. Всего исследовано 190 проб.

Источником специфических антител служили гипериммунные кроличьи сыворотки, полученные иммунизацией животных FI-антигеном, а также поливалентные сыворотки, полученные после иммунизации кроликов вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV. Адсорбцию поливалентной чумной сыворотки проводили с использованием клеток *Yersinia pseudotuberculosis* И-686. Фракцию иммуноглобулинов G (IgG) выделяли комбинированным методом с применением каприловой кислоты и сульфата аммония [9].

Для постановки ДИА нами сконструировано два вида тест-систем: IgG из сыворотки, полученной против фракции I чумного микроба, меченные коллоидным серебром (aFI=KC), и IgG из адсорбированной поливалентной противочумной сыворотки, меченные коллоидным серебром (IgG=KC).

Приготовление коллоидного серебра и его комплексообразование со специфическими IgG осуществляли по методу А.Г.Полтавченко и соавт. [4]. Технология конструирования тест-систем включала следующие этапы: получение золя серебра с заданной дисперсностью путем смешивания равных объемов водных растворов боргидрида натрия и азотнокислого серебра, получение комплекса маркера со специфическими антителами, стабилизация конъюгатов и блокирование свободных сайтов связывания на поверхности частиц серебра [4, 5, 11].

Постановку реакции осуществляли с использованием прямого варианта дот-иммуноанализа, как более экспрессного, экономичного и, на наш взгляд, более приемлемого для работы в полевых условиях. Постановка реакции заключалась в нанесении исследуемого материала на твердофазный носитель (нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Synpro» с размером пор 0,45 мкм); блокировании свободных участков связывания раствором инертного белка (казеинат натрия либо бычий сывороточный альбумин); детекции адсорбированных антигенов с помощью конъюгатов противочумных IgG, меченных колло-

идным серебром. Учет результатов проводили после погружения мембраны в раствор проявителя, состоящего из метола, лимонной кислоты и азотнокислого серебра, путем визуальной оценки проявившихся темно-серых пятен в местах нанесения положительного контроля и проб, содержащих антигены чумного микроба [1, 11]. Интенсивность окрашивания пятен оценивалась от + до +++++. Для проведения сравнительного анализа использовали реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с чумным эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом (производства НИИ микробиологии МО РФ, Россия), применяющуюся традиционно в полевых условиях.

В качестве положительных контролей использовали инактивированную взвесь чумного микроба *Y. pestis* EV концентрацией 10^6 КОЕ/мл и FI – 10 нг/мл, в качестве отрицательного контроля – проба, не содержащую антиген (разводящая жидкость).

Проверку специфичности дот-иммуноанализа осуществляли со штаммами близкородственных бактерий: *Yersinia enterocolitica* O:3 (референтный штамм *Y. enterocolitica* И-134), *Y. enterocolitica* O:9 (референтный штамм *Y. enterocolitica* И-76), *Y. pseudotuberculosis* (референтные штаммы *Y. pseudotuberculosis* И-53, *Y. pseudotuberculosis* И-72), *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ концентрацией 10^6 КОЕ/мл. Ввиду того, что в полевом материале высокие концентрации возбудителя чумы (10^8 – 10^9 КОЕ/мл) практически не встречаются, а при разработке тест-систем учитывалось данное обстоятельство, то и для проверки специфичности более высокие концентрации гетерологичных микроорганизмов не применялись.

Проверку чувствительности ДИА проводили с использованием 4 типичных штаммов чумного микроба основного и алтайского подвидов (*Y. pestis* subsp. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica*) из коллекции музея живых культур института.

Результаты и обсуждение

Из числа рутинных серологических методов индикации дот-иммуноанализ обладает преимуществом по чувствительности, скорости проведения реакции, экономичности расходования исследуемого материала и реагентов. Принцип работы сконструированных тест-систем основан на выявлении специфических антигенных комплексов, адсорбированных на твердофазном носителе.

Нами показана стабильная высокая чувствительность обеих сконструированных тест-систем (aFI=KC и IgG=KC) при исследовании штаммов чумного микроба – $\geq 5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл и растворимых антигенов (FI) – $\geq 4,8$ нг/мл, а также высокая специфичность: отсутствие ложноположительных реакций с 5 гетерологичными микроорганизмами в концентрации 10^6 КОЕ/мл.

При исследовании полевого материала (190 проб) методом ДИА были получены положительные результаты в 8 пробах (смывы с органов длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* – 4, даурской пищухи *Ochotona daurica* – 3, плоскочерепной полевки *Alticola strelzovi* – 1), что составило 4,2 %.

Результаты серологических исследований полевого материала из Горно-Алтайского природного очага чумы

Код образца	Исследуемый материал	ДИА с использованием диагностикумов:		РПГА
		aFI – KC	п/в AT-KC	
37	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:80
101	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:40
162	Смыв с органов даурской пищи	1:80 (++)	1:80 (+++)	-
183	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:80
70	Смыв с органов даурской пищи	1:160 (+++)	1:160 (+++)	1:40
14	Смыв с органов даурской пищи	1:160 (++)	1:160 (+++)	1:20
171	Смыв с органов плоскочерепной полевки	1:80 (++)	1:80 (+++)	-
157	Смыв с органов даурской пищи	1:80 (++)	1:80 (+++)	-

Примечание: в таблице приведены максимальные значения разведений исследуемого материала.

Существенной разницы при использовании тест-систем на основе aFI=KC и поливалентного IgG=KC не отмечено (таблица). Интенсивность окрашивания сформированных в положительных случаях пятен соответствовала ++ – +++++. Время, затраченное на постановку ДИА, в среднем составило 1,5 ч. Все пробы были изучены в трех повторностях. Воспроизводимость результатов составила 100 %.

Обнаружение антигенов чумного микроба в РПГА зарегистрировано в 5 пробах, что составило 2,6 %. Время от начала постановки РПГА до учета результатов в среднем 3 ч. Совпадение положительных результатов в ДИА и РПГА отмечалось в 5 образцах. На наш взгляд, большее количество положительных находок, полученных методом ДИА, в сравнении с РПГА объясняется более высокой чувствительностью твердофазных иммунохимических методов по сравнению с агглютинационными. Вместе с тем ДИА более экспрессивен (время проведения анализа – 1,5 ч), требует небольшого объема исследуемого образца (1–2 мкл) и расходных материалов (таблица).

Таким образом, разработанные и апробированные нами при исследовании полевого материала тест-системы с использованием противочумных IgG, меченных коллоидным серебром, для детекции антигенов возбудителя чумы высокочувствительны, специфичны, экспрессны, экономичны, не требуют оснащения лабораторий дорогостоящими реактивами и оборудованием. Простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов позволяют их реализовывать в качестве сигнальных тестов в полевых условиях, а также в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад (СПЭБ) в режиме чрезвычайных ситуаций. Кроме того, применение разработанных тест-систем позволит оперативно осуществлять эпидемиологический мониторинг и проводить быструю оценку ситуации при возникновении биологических угроз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П.

Современные подходы к конструированию диагностических тест-систем с использованием неорганических корпускулярных меток. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 1(2):176–80.

2. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Усп. химии*. 2007; 76(2):199–213.

3. Онищенко Г.Г., Сандакчиев Л.С., Нетесов С.В. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник РАН*. 2003; 73(3):195–204.

4. Полтавченко А.Г., Тузиков Ф.В., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Получение серебряных золь – маркеров для иммуноанализа. *Сибирь-Восток*. 2002; 4(52):18–20.

5. Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Перспективы использования коллоидного серебра как маркера в иммуноанализе. *Сибирь-Восток*. 2002; 3(51):10–2.

6. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. *Биотехнология*. 2007; 3:88–94.

7. Bellamy R.J., Freedman A.R. Bioterrorism. *QJM*. 2001; 94(4):227–34.

8. Iqbal S.S., Chambers J.P., Goode M.T., Valdes J.J., Brubaker R.R. Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol. Cell Probes*. 2000; 14(2):109–14.

9. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.* 1987; 96(2):271–8.

10. Rasoamanana B., Leroy F., Boiesier P., Rasolomaharo M., Buchy P., Carniel E., Chanteau S. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(5):587–91.

11. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. One World-One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of International Conference (11–12 April 2013). Ulaanbaatar; 2013. P. 187–91.

References

1. Zagoskina T.Yu., Golubinsky E.P., Merinov S.P. [Modern approaches to the construction of diagnostic test-systems using non-organic corpuscular labels]. *Byul. VSNC SO RAMN*. 2004; 1(2):176–80.

2. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. [Gold nano-particles: obtaining, functionalisation, application in biochemistry and immunochemistry]. *Uspekhi Khimii*. 2007; 76(2):199–213.

3. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V. [Bioterrorism: national and global menace]. *Vestnik RAN*. 2003; 73(3):195–204.

4. Poltavchenko A.G., Tuzikov F.V., Poltavchenko D.A., Zagoskina T.Yu. [Obtaining of silver sols – markers for immunoassay]. *Sibir-Vostok*. 2002; 4(52):18–20.

5. Poltavchenko A.G., Poltavchenko D.A., Zagoskina T.Yu. [Prospects for application of colloid silver as immunoassay marker]. *Sibir-Vostok*. 2002; 3(51):10–2.

6. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M. [Multi-field serodiagnostics of infectious diseases]. *Biotechnologiya*. 2007; 3:88–94.

7. Bellamy R.J., Freedman A.R. Bioterrorism. *QJM*. 2001; 94(4):227–34.

8. Iqbal S.S., Chambers J.P., Goode M.T., Valdes J.J., Brubaker R.R. Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol. Cell Probes*. 2000; 14(2):109–14.

9. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.* 1987; 96(2):271–8.

10. Rasoamanana B., Leroy F., Boiesier P., Rasolomaharo M., Buchy P., Carniel E., Chanteau S. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(5):587–91.

11. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. One World-One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of International Conference (11–12 April 2013). Ulaanbaatar; 2013. P. 187–91.

Authors:

Noskova O.A., Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Gridneva L.G. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Mikhailov E.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Об авторах:

Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Грднева Л.Г. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Триллссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Михайлов Е.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Поступила 07.04.14.