

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-192-195

УДК 616.98:579.842.23

Р.Р. Салихов, Е.М. Кузнецова, О.А. Волох

Оценка адсорбционной активности бактериальных клеток на модели *Yersinia pseudotuberculosis*

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В настоящее время в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора осуществляется выпуск диагностических иммуноглобулинов, используемых в лабораторной диагностике возбудителя чумы. Одним из важных этапов получения данной категории препаратов является процесс адсорбции и удаления перекрестно реагирующих антител для повышения специфичности препарата. С этой целью используются инактивированные клетки штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. **Цель работы** – оценка возможности применения иммунохимических методов для анализа адсорбционных свойств бактериальных клеток, с последующим анализом влияния условий культивирования, способа культивирования, варианта используемого штамма на адсорбционные свойства бактериальных клеток. **Материалы и методы.** Культивирование проводили на плотной и жидкой питательных средах, инактивацию клеток проводили путем температурного и химического воздействия. Оценка адсорбционной активности осуществляли методами иммуноблоттинга и ингибирующего иммуноферментного анализа. Статистическую обработку результатов проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа. **Результаты и обсуждение.** Показана применимость методов иммуноблоттинга и ингибирующего ИФА для качественной и количественной оценки адсорбционных свойств бактериальных клеток. Установлено, что на адсорбционные свойства бактериальных клеток влияет способ инактивации и внесение субстратной подкормки, способ культивирования не оказывает воздействия на адсорбционные свойства клеток.

Ключевые слова: иммуноглобулины диагностические чумные, *Yersinia pseudotuberculosis*, адсорбция перекрестно реагирующих антител, ингибирующий иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Салихов Руслан Римович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Салихов Р.Р., Кузнецова Е.М., Волох О.А. Оценка адсорбционной активности бактериальных клеток на модели *Yersinia pseudotuberculosis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1:192–195. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-192-195
Поступила 11.12.2023. Принята к публ. 19.12.2023.

R.R. Salikhov, E.M. Kuznetsova, O.A. Volokh

Assessment of the Adsorption Activity of Bacterial Cells Using *Yersinia pseudotuberculosis* Model

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Currently, the Russian Anti-Plague Institute “Microbe” produces diagnostic immunoglobulins used in laboratory diagnostics of plague pathogen. One of the important stages in obtaining this category of drugs is the process of adsorption and removal of cross-reacting antibodies to increase the specificity of the drug. For this purpose, inactivated cells of *Yersinia pseudotuberculosis* strains are used. **The aim** of the work was to assess the possibility of using immunochemical methods to analyze the adsorption properties of bacterial cells, followed by an assessment of the impact of cultivation method and conditions, and the variant of the strain used on the adsorption properties of bacterial cells. **Materials and methods.** Cultivation was carried out on solid and liquid nutrient media; cells were inactivated by temperature and chemical exposure. Adsorption activity was assessed using immunoblotting and inhibitory enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical processing of the results was performed using two-factor analysis of variance. **Results and discussion.** The suitability of immunoblotting and inhibitory ELISA methods for qualitative and quantitative assessment of the adsorption properties of bacterial cells has been demonstrated. It has been established that the adsorption properties of bacterial cells are influenced by the method of inactivation and the application of substrate feeding; the method of cultivation does not affect the adsorption properties of cells.

Key words: diagnostic plague immunoglobulins, *Yersinia pseudotuberculosis*, adsorption of cross-reacting antibodies, inhibitory enzyme-linked immunoassay.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Ruslan R. Salikhov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Salikhov R.R., Kuznetsova E.M., Volokh O.A. Assessment of the Adsorption Activity of Bacterial Cells Using *Yersinia pseudotuberculosis* Model. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 1:192–195. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-192-195
Received 11.12.2023. Accepted 19.12.2023.

Salikhov R.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-4109>
Kuznetsova E.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0441-9269>

Volokh O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

В ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в настоящее время выпускают ряд препаратов, используемых для индикации возбудителя на разных этапах лабораторной диагностики чумы. При производстве иммуноглобулинов диагностических чумных одним из важных этапов является процесс адсорбции и удаления перекрестно реагирующих антител, что приводит к увеличению специфичности препарата. Адсорбирующим агентом в этом случае выступают инактивированные клетки штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*.

Согласно литературным данным, представители рода *Yersinia* обладают гомологичными белками, которые приводят к перекрестному взаимодействию с неспецифическими антителами иммунных сывороток [1–3]. Подавляющее большинство исследований в данной предметной области направлено на совершенствование получаемых иммунных сывороток. Наряду с этим, перспективным направлением является изучение адсорбционных свойств клеток, применяемых для повышения специфичности действия конечного препарата.

С целью эффективного проведения адсорбции необходимо предварительно провести оценку степени взаимодействия адсорбента и иммунной сыворотки. Для количественной и качественной оценки, согласно литературным данным, возможно использование методов иммуноблоттинга и протеомных микрочипов [1, 3]. Кроме того, перспективным вариантом количественной оценки адсорбционной активности клеток-адсорбентов является ингибирующий иммуноферментный анализ, применяемый в качестве метода контроля свойств получаемых антигенов на некоторых этапах биотехнологических производств [4].

Ранее нами была предложена схема оптимизации условий культивирования штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis* [5]. Наряду с этим, определение адсорбционной активности штаммов-адсорбентов имеет важный практический аспект. В частности, мы предполагаем, что нахождение оптимальных условий культивирования *Y. pseudotuberculosis* и подбор штаммов в перспективе позволят уменьшить затраты на производство диагностического чумного иммуноглобулина и повысить его специфичность без снижения чувствительности.

Целью нашей работы является оценка возможности использования метода иммуноблоттинга и ингибирующего иммуноферментного анализа (ИФА) для количественной и качественной оценки адсорбционных свойств клеток *Y. pseudotuberculosis*, проведение анализа влияния различных штаммов, условий культивирования, методов инактивации клеточной биомассы на адсорбционные свойства штаммов-адсорбентов.

Материалы и методы

В работе использовались штаммы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70. В качестве контроль-

ного штамма для оценки адсорбции использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Адсорбционные свойства клеток исследовали при взаимодействии с чумной неадсорбированной лошадиной сывороткой, являющейся полуфабрикатом при производстве чумного диагностического иммуноглобулина.

Для оценки влияния способа культивирования на адсорбционные свойства клеток проводили серию культивирований на двух типах сред. В качестве плотной питательной среды использовали агар Хоттингера, pH 7,2. Бульонную культуру получали в условиях шейкера-инкубатора с использованием среды на основе ферментативного гидролизата фибрина с водородным показателем 7,2 и содержанием аминного азота 0,1 %. Проводили 18-часовое шутеллирование при скорости 130 об/мин и температуре 28 °С.

Инактивацию биомассы осуществляли тремя различными способами: первый – путем внесения формалина до конечной концентрации 0,6 % и последующей инкубации в течение 18 ч, второй – путем внесения мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 % и последующей инкубации в течение 30 мин при температуре 56 °С, третий – кипячением в течение 30 мин.

Определение пула перекрестно реагирующих белков проводили с использованием иммуноблоттинга по методу Н. Towbin *et al.* [6] с чумной неадсорбированной сывороткой. Белковый профиль клеток микроорганизмов получали с помощью SDS-PAGE по U.K. Laemmli [7] в 12 % разделительном геле. Адсорбционную активность клеток – адсорбентов *Y. pseudotuberculosis* определяли методом ингибирующего иммуноферментного анализа [4].

Оценку влияния факторов на адсорбционную активность клеток производили с помощью использования двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (Two Way ANOVA Test) [8]. В качестве пограничного уровня статистической значимости принимали $p \leq 0,05$. Апостериорный анализ проводили с использованием процедуры Тьюки – Крамера (Tukey HSD test).

Результаты и обсуждение

По интенсивности взаимодействия неадсорбированной чумной сыворотки с клетками штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* EV методом иммуноблоттинга определены перекрестно взаимодействующие белки с молекулярной массой в диапазоне от 10 до 70 кДа, что согласуется с литературными данными [1].

В ходе многофакторного дисперсионного анализа результатов проведенных экспериментов установлено, что внутригрупповая изменчивость не вносила существенного влияния на конечные результаты экспериментов, что, в свою очередь, указывает на достоверность полученных результатов и применимость

метода ингибирующего ИФА для анализа адсорбционной активности клеток штаммов-адсорбентов. Адсорбционная активность клеток *Y. pestis* EV, являющихся иммунизирующим агентом для получения чумной сыворотки, статистически значимо превосходила аналогичный показатель для большинства штаммов *Y. pseudotuberculosis* и в дальнейшей работе принята в качестве положительного контроля.

На следующем этапе проводили оценку влияния физико-химических способов инактивации штаммов-адсорбентов на изменение адсорбционной емкости получаемых клеток. Предполагалось, что некоторые методы воздействия на бактериальную клетку могут оказывать влияние на иммуноактивные комплексы бактериальных клеток. Установлено, что применяемый вариант инактивации влияет на адсорбционную активность клетки. После температурного воздействия (100 °C в течение 30 мин) адсорбционная активность клеток была статистически ниже (14,2±2,3 %), чем аналогичный показатель при инактивировании формалином (28,5±5,5 %) и мертиолятом натрия (20,3±4,0 %), статистически значимая разница при инактивировании последними двумя вариантами не обнаружена. Более низкий показатель адсорбции после температурного воздействия на клетки-адсорбенты, чем при использовании химических способов инактивирования, по всей видимости, объясняется денатурирующими процессами, происходящими в структурах клетки при воздействии высокой температуры. В ходе дальнейшего исследования использовался вариант инактивации формалином.

На следующем этапе изучали влияние способа культивирования клеток на их адсорбционную активность. Установлено, что культивирование как на плотной, так и на жидкой питательных средах не оказывало статистически значимого влияния на количество перекрестно реагирующих антител адсорбируемых клетками гетерологичных штаммов.

Ранее нами было показано увеличение выхода биомассы для штаммов *Y. pseudotuberculosis* при внесении в культуральную жидкость углеводных субстратных подкормок: глюкозы и галактозы [5]. В ходе проведенных экспериментов установлено, что при внесении в культуральную жидкость указанных моносахаров адсорбционная активность клеток составила (40,6±3,1) % для глюкозы, (41,6±2,3) % для галактозы, что статистически значимо превосходит адсорбционную активность клеток, полученных без добавления субстратных подкормок.

В ходе работы установлено, что штаммы *Y. pseudotuberculosis* 31 и 70 в большинстве случаев несколько превосходят остальные штаммы (*Y. pseudotuberculosis* 6, 68, 69) по сорбционной активности. Коэффициенты адсорбции составили (36,7±6,2), (40,7±6,4), (47,3±5,9), (41,6±4,6), (31,5±5,4) % для штаммов *Y. pseudotuberculosis* 6, 68, 31, 70, 69 соответственно.

Таким образом, в ходе проведенного исследования определены группы белков, принадлежа-

щие клеткам штаммов *Y. pestis* EV линии НИИЭГ и *Y. pseudotuberculosis*, ответственные за перекрестное взаимодействие с антителами чумной неадсорбированной сыворотки. Проведена апробация метода ингибирующего ИФА для количественного определения адсорбционной активности штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Установлено, что вариант инактивирования путем нагрева снижает адсорбционную активность клеток, химические варианты инактивации (формалин, мертиолят натрия) являются более щадящими. Показано, что способ культивирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* не влияет на адсорбционную активность их клеток. Отмечено увеличение адсорбционной активности клеток, полученных при культивировании с внесением субстратных подкормок в виде глюкозы или галактозы.

В ходе дальнейшей работы с использованием методов иммуноблоттинга и ингибирующего ИФА, с последующим многомерным анализом данных, будет проведен скрининг штаммов *Y. pseudotuberculosis* из Государственной коллекции патогенных бактерий института «Микроб», перспективных в качестве адсорбентов при получении диагностических иммуноглобулинов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Khushiramani R., Tuteja U., Shukla J., Batra H.V. Characterization of outer membrane proteins of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains isolated from India. *Indian J. Exp. Biol.* 2004; 42(5):508–14.
2. Chen Y., Duan R., Li X., Li K., Liang J., Liu C., Qiu H., Xiao Y., Jing H., Wang X. Homology analysis and cross-immunogenicity of OmpA from pathogenic *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Mol. Immunol.* 2015; 68(2 Pt. A):290–9. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.09.016.
3. Keasey S.L., Schmid K.E., Lee M.S., Meegan J., Tomas P., Minto M., Tikhonov A.P., Schweitzer B., Ulrich R.G. Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* 2009; 8(5):924–35. DOI: 10.1074/mcp.M800213-MCP200.
4. Sharma N., Hanif S., Upadhyay D., Chhikara M.K. Inhibition ELISA as a putative tool for the identification and quantification of meningococcal A and X polysaccharides at various stages of vaccine development. *J. Immunol. Methods.* 2019; 473:112634. DOI: 10.1016/j.jim.2019.112634.
5. Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Оптимизация условий культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе получения клеточной массы. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 4:137–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142.
6. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.
8. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: Физматлит; 2006. 816 с.

References

1. Khushiramani R., Tuteja U., Shukla J., Batra H.V. Characterization of outer membrane proteins of *Yersinia pestis* and *Yersinia*

pseudotuberculosis strains isolated from India. *Indian J. Exp. Biol.* 2004; 42(5):508–14.

2. Chen Y., Duan R., Li X., Li K., Liang J., Liu C., Qiu H., Xiao Y., Jing H., Wang X. Homology analysis and cross-immunogenicity of OmpA from pathogenic *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Mol. Immunol.* 2015; 68(2 Pt. A):290–9. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.09.016.

3. Keasey S.L., Schmid K.E., Lee M.S., Meegan J., Tomas P., Minto M., Tikhonov A.P., Schweitzer B., Ulrich R.G. Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* 2009; 8(5):924–35. DOI: 10.1074/mcp.M800213-MCP200.

4. Sharma N., Hanif S., Upadhyay D., Chhikara M.K. Inhibition ELISA as a putative tool for the identification and quantification of meningococcal A and X polysaccharides at various stages of vaccine development. *J. Immunol. Methods.* 2019; 473:112634. DOI: 10.1016/j.jim.2019.112634.

5. Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. [Optimization of the conditions for cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the process of obtaining cell mass]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (4):137–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142.

6. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1979; 76(9):4350–4. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.

7. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0.

8. Kobzar A.I. [Applied Mathematical Statistics. For Engineers and Scientists]. Moscow: "Fizmatlit"; 2006. 816 p.

Authors:

Salikhov R.R., Kuznetsova E.M., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Салихов Р.Р., Кузнецова Е.М., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.