

А.М.Барков, И.А.Баркова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, М.Я.Кулаков

# ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ПРОТЕКТИВНОМУ АНТИГЕНУ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Протективный антиген, выделенный гель-хроматографией с помощью сефакрила S-300 из КФ штамма *B. anthracis* СТИ, использован для обнаружения антител. Чувствительность РНГА и ТИФМ с гипериммунной сывороткой к ПА соответствовала титрам 1:128000 – 1:256000. Специфическая активность РНГА с сыворотками 22 морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, была в титре 1:40 – 1:81920, ТИФМ – 1:160 – 1:81920. В сыворотках больных сибирской язвой титры антител обнаружены в РНГА в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ – 1:800 – 1:12800. Отмечено нарастание титра антител в парных сыворотках в зависимости от срока заболевания. Специфичность РНГА подтверждена РТНГА с ПА. Оба метода равнозначны для диагностики заболевания, однако преимущество РНГА в простоте, скорости постановки и учета результатов.

**Ключевые слова:** протективный антиген (ПА), эритроцитарный диагностикум, реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ).

Протективный антиген (ПА) один из основных компонентов сибирезывенного токсина, который играет ведущую роль в патогенезе заболевания.

Твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ) с ПА широко использовался для определения антител в сыворотках животных, людей при изучении химических и живых вакцин, а также для диагностики сибирской язвы при эпидемических вспышках и биотеррористическом акте в США 2001 г. [13, 14, 16]. Эритроцитарные диагностикумы, полученные на основе ПА, выделенного из культурального фильтрата различными способами, отличались по специфичности и чувствительности [1, 7, 12].

При обнаружении антител к ПА в сыворотках экспериментальных животных, вакцинированных и больных сибирской язвой лиц одни авторы указывают на более высокую чувствительность ТИФМ, по данным других – реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и ТИФМ равноценны, однако отмечена нестабильность эритроцитарных диагностикумов, полученных с использованием не обработанных формалином эритроцитов [1, 12].

В предыдущих работах мы сообщали о выделении из культурального фильтрата токсинпродуцирующего штамма *B. anthracis* СТИ гель-хроматографией на сефакриле S-300 доминирующего белка, который элюировался в объеме фракции 5 и идентифицирован как протективный антиген (ПА) [2, 3, 8].

В настоящее время в РФ не зарегистрировано сертифицированных эритроцитарных диагностикумов и иммуноферментных тест-систем для обнаружения антител к протективному антигену [10].

Цель работы – определить возможность использования протективного антигена, выделенного гель-хроматографией из культурального фильтрата

токсинпродуцирующего штамма, для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы в РНГА и ТИФМ.

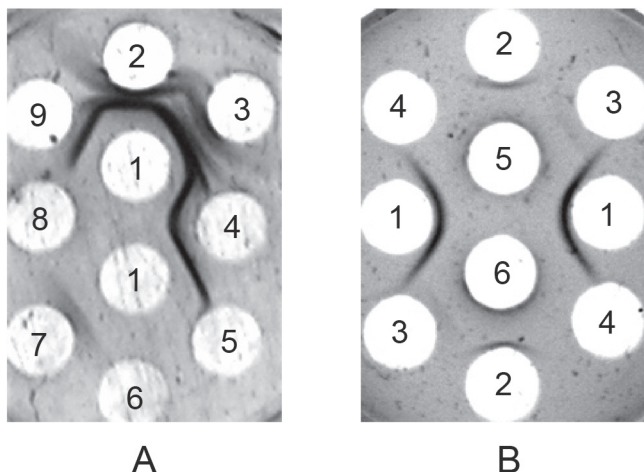
## Материалы и методы

Антитела к возбудителю сибирской язвы определяли в 22 сыворотках морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, а также в парных сыворотках 5 больных кожной формой сибирской язвы. Сыворотки от выживших животных взяты на 21–35-й день после заражения. В качестве отрицательного контроля использованы сыворотки 10 интактных животных и 32 сыворотки практически здоровых людей. В качестве контрольного положительного образца служила гипериммунная кроличья сыворотка (кролик № 903) к фракции 5, которая выделена гель-хроматографией из культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ и охарактеризована как ПА [2]. К сывороткам добавляли мертиолат 1:10000, инактивировали при 56 °С в течение 30 мин, хранили при 4 °С.

Специфическую активность сывороток морских свинок и больных людей изучали в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) [11] с культуральными фильтратами штаммов: токсинпродуцирующего – *B. anthracis* СТИ (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>); капсулообразующего – *B. anthracis* Davies (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>+</sup>); бесплазмидного – *B. anthracis* 81/1TR (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>-</sup>), коллекция патогенных бактерий Волгоград НИПЧИ.

Антигенный эритроцитарный диагностикум получали с использованием формализованных эритроцитов барана, которые перед сенсibilизацией обрабатывали алкилсульфатом натрия (АСН) [9].

РНГА и РТНГА ставили в микроварианте по



Реакция иммунодиффузии в геле с сыворотками:

**А** – больных кожной формой сибирской язвы:

1 – культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ в разведении 1:4;

2 и 3 – кроличья сыворотка к фракции 5 культурального фильтрата

*B. anthracis* СТИ целая и в разведении 1:2; 4 и 5 – сыворотки больного Ф., взятые на 5-е и 14-е сутки заболевания; 6 и 7 – сыворотки больного Г., взятые на 6-е и 15-е сутки заболевания; 8 и 9 – сыворотки больного Л., взятые на 2-е и 16-е сутки заболевания.

**В** – морских свинок, выживших после заражения сибирской язвой:

1 – фракция 5 (ПА) культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ;

2 – культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ; 3 – культуральный фильтрат *B. anthracis* 81/1 TR; 4 – культуральный фильтрат *B. anthracis* Davies; 5 и 6 – сыворотки морских свинок, получивших НАФ и выживших после заражения *B. anthracis* 81/1

общепринятой методике в объеме 100 мкл с 1 % эритроцитарным диагностикумом [11].

В качестве разводящей жидкости (РЖ) использовали фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2±0,2, (ФБР) с 0,05 мл твин-20 «Serva» (ФБРТ), 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), ТУ 644-2-278-79, с 1 % формалина.

При постановке РНГА сыворотки титровали в разводящей жидкости в равном объеме (по 50 мл), к которому добавляли 25 мкл разводящей жидкости и 25 мкл 1 % эритроцитарного диагностикума. В РТНГА сыворотки титровали как в РНГА, во все лунки добавляли 25 мкл ПА с концентрацией 10 мкг/мл, после 30 мин инкубации вносили диагностикум.

Для выявления иммуноглобулинов в ТИФМ использованы антивидовые иммунопероксидазные конъюгаты «Медгамал», тетраметилбензидин (ТМБ) «Serva» и полистироловые планшеты фирмы «Costar». Результат учитывали на микропланшетном фотометре для иммуноферментного анализа Stat Fax 2100 Awareness Technology ОП<sub>проб</sub> > 0,4, ОП<sub>контролей</sub> < 0,2.

### Результаты и обсуждение

При изучении в РИД с культуральным фильтратом токсинпродуцирующего штамма парные сыворотки больных кожной формой сибирской язвы, полученные на 4–6-е сутки заболевания, иммунопреципитаты не образовывали, а сыворотки, взятые на 14–16-е сутки заболевания, и контрольная положительная сыворотка выявляли идентичный антиген (рисунок, А).

Сыворотки морских свинок, которым вводили неполный адъювант Фрейнда (НАФ) по схеме иммунизации и выжившие после заражения спорами *B. anthracis* 81/1, реагировали с антигенами фракции 5 культурального фильтрата токсинпродуцирующего штамма и не выявляли антигены культуральных фильтратов бесплазмидного и капсулообразующего штаммов, что свидетельствовало о наличии в сыворотках антител к протективному антигену сибиреязвенного микроба (рисунок, В).

Сыворотки экспериментальных животных и больных сибирской язвой людей исследованы в РНГА и ТИФМ.

При получении антигенного эритроцитарного диагностикума 10 % формализованные эритроциты инкубированы при 45 °С в течение 15 мин с алкилсульфатом натрия в конечной концентрации 0,3 %, затем сенсibilизированы различными дозами ПА.

Оптимальная сенсibilизирующая доза для 10 % взвеси эритроцитов установлена в концентрации ПА 300 мкг/мл белка, для планшет «Costar» – 10 мкг/мл.

Чувствительность ТИФМ и РНГА с контрольной положительной сывороткой к ПА оказалась практически одинаковой и соответствовала титрам 1:128000 – 1:256000.

При проверке специфичности РНГА и ТИФМ с 6 сыворотками интактных морских свинок и 4 сыворотками морских свинок, получивших НАФ, ложноположительные результаты получены в титрах: РНГА ≤ 1:5, ТИФМ ≤ 1:80 (ОП < 0,4). С 32 сыворотками практически здоровых людей ложноположительные результаты были в титрах РНГА ≤ 1:10, ТИФМ ≤ 1:200 (ОП < 0,4).

Диагностический титр для сывороток морских свинок и людей установлен соответственно в РНГА 1:10 и 1:20, в ТИФМ 1:160 и 1:400 (ОП > 0,4).

Как следует из обобщенных результатов по изучению специфической активности (табл. 1), с 22 сыворотками не иммунизированных и иммунизированных морских свинок, выживших на 21-й и 35-й день после заражения различными дозами возбудителя сибирской язвы, получены положительные результаты в РНГА и ТИФМ соответственно в титрах 1:40 – 1:81920 и 1:160 – 1:81920.

С сыворотками людей, больных кожной формой сибирской язвы, положительные результаты РНГА были в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ – 1:800 – 1:12800. Отмечено нарастание титра антител в сыворотках больных в зависимости от срока заболевания (табл. 2).

Специфичность РНГА подтверждена РТНГА с ПА в концентрации 10 мкг/мл, в которой отмечено снижение титров: с 1:128000 до 1:2000, с 1:40960 до 1:320, с 1:5120 до 1:40.

Результаты РТНГА свидетельствовали, что на сенсibilизированных эритроцитах адсорбирован антиген, антитела к которому содержатся в контрольной положительной сыворотке к ПА, в сыворотках зараженных морских свинок и больных сибирской

Таблица 1

Специфичность и специфическая активность РНГА и ТИФМ при обнаружении антител к ПА в сыворотках морских свинок, зараженных и не зараженных спорами сибирской язвы				
Иммунизация	Заражающая доза (СП)	Количество выживших/зараженных	Обратные титры	
			РНГА	ТИФМ
<i>B. anthracis</i> 81/1R (pXO1 <sup>+</sup> , pXO2 <sup>-</sup> )	6·10 <sup>1</sup>	3/5	40960	10240
			640	1280
			1280	2560
	6·10 <sup>2</sup>	3/5	10240	81920
1-й фракцией* <i>B. anthracis</i> 81/1TR (pXO1 <sup>+</sup> , pXO2 <sup>-</sup> )	2·10 <sup>3</sup>	4/5	20480	10240
			1280	5120
			1280	>1280
	2·10 <sup>3</sup>	4/5	10	320
7-й фракцией* <i>B. anthracis</i> СТИ (pXO1 <sup>+</sup> , pXO2 <sup>-</sup> )	2·10 <sup>3</sup>	4/5	81920	81920
			1280	2560
			40960	81920
	2·10 <sup>3</sup>	4/5	2560	81920
5-й фракцией* <i>B. anthracis</i> СТИ (pXO1 <sup>+</sup> , pXO2 <sup>-</sup> )	2·10 <sup>4</sup>	3/5	81920	81920
			81920	81920
			20480	81920
	2·10 <sup>4</sup>	3/5	81920	81920
Введение НАФ по схеме иммунизации	5·10 <sup>1</sup>	2/5	10	<80
			1280	640
			160	320
	2·10 <sup>2</sup>	2/5	40	320
Интактные животные	Не заражали	4	≤5	≤80
			≤5	≤80
Сыворотка к ПА, кролик № 903		1	128000	256000

Примечание: НАФ – неполный адъювант Фрейнда, СП – споры, \* – препараты вводили с НАФ.

язвой людей.

В результате проведенных нами исследований показано, что ПА, содержащийся во фракции 5, может использоваться в РНГА и ТИФМ для обнаружения сибиреязвенных антител. Сыворотка к фракции 5 содержала антитела к белку молекулярной массы 84 кДа, соответствующей ПА, который был доминирующим в культуральном фильтрате токсинпродуцирующего штамма и обладал протективными свойствами [2, 3, 8]. Принадлежность к ПА белков фракции 5 также подтверждают данные РИД, где сыворотки морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, содержали антитела к антигену фракции 5 и не реагировали с антигенами культуральных фильтратов бесплазмидного и капсулообразующего штаммов, не продуцирующих ПА.

Наличие антител в сыворотках выживших морских свинок, которым вводили неполный адъювант Фрейнда до заражения, может свидетельствовать о последовательном развитии факторов неспецифической и специфической резистентности. Повидимому, предшествующее заражению введение НАФ стиму-

Таблица 2

Специфичность и специфическая активность РНГА и ТИФМ при обнаружении антител к ПА в сыворотках людей, больных кожной формой сибирской язвы				
Сыворотки больных	Дата заболевания	Дата получения сывороток	Обратные титры	
			РНГА	ТИФМ
Ф	4.09.03	16.09.03	10240	12800
		18.09.03	20480	12800
Л	16.09.03	18.09.03	20	800
		2.10.03	2560	6400
Г	3.09.03	9.09.03	20	800
		18.09.03	1280	3200
Лт*	14.09.09	22.09.08	20	800
		13.10.08	40	800
Лн*	14.09.09	22.09.08	20	800
		13.10.08	160	1600
32 сыворотки лиц контрольной группы		04.2005	29 сыв – 5; 11 сыв – 200; 3 сыв – 10	21 сыв ≤200
Сыворотка к ПА, кролик № 903		06.2002	128000	256000

\*Более низкие титры антител к ПА в сыворотках больных Лт и Лн обусловлены антибиотикотерапией, начатой в ранние сроки заболевания.

лировало фагоцитарную активность, которая на начальных этапах заболевания сибирской язвой играет немаловажную роль [6, 8]. Специфическая резистентность морских свинок подтверждена наличием сибиреязвенных антител в сыворотках животных, выживших после заражения.

Следовательно, путем активации факторов неспецифической резистентности, возможно моделирование сибиреязвенной инфекции с изучением динамики антител к антигенам *B. anthracis* при остром течении заболевания и в процессе выздоровления животных. Использование данного метода позволило получить сыворотки морских свинок, зараженных до 2·10<sup>2</sup> спор *B. anthracis* 81/1 [4].

Специфическая активность обоих тестов при исследовании сывороток людей, больных кожной формой сибирской язвы, и морских свинок, выживших после заражения, оказалась практически одинаковой. Сыворотки людей, больных кожной формой сибирской язвы, содержали антитела, определяемые в РНГА в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ 1:800 – 1:12800. С сыворотками морских свинок, выживших после заражения, титры РНГА и ТИФМ составили соответственно 1:40 – 1:81920 и 1:160 – 1:81920.

Таким образом, ТИФМ с ПА и РНГА с эритроцитарным диагностикумом, полученным на основе стабилизированных формалином эритроцитов, сенсibilизированных протективным антигеном с использованием алкилсульфата натрия в качестве конъюгирующего компонента, характеризуются высокой чувствительностью и специфической активностью и могут использоваться для диагностики сибирской язвы.



Учитывая практически одинаковую диагностическую чувствительность и специфичность диагностик эритроцитарного сибирезавенного антигенного и иммуноферментной тест-системы для обнаружения антител к ПА, технологичность изготовления, стоимость производства эритроцитарного диагностик, простоту, небольшое время постановки и учета результатов РНГА и РТНГА, предпочтительней использование эритроцитарного диагностик.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалакин В.А., Сергеева Л.В., Черкасский Б.Л. Выявление специфических антигенов при экспериментальной сибирской язве. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 12:63–7.
2. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. Использование иммуноглобулинов к отдельным внеклеточным антигенам *Bacillus anthracis* СТИ для идентификации сибирезавенного микроба. Биотехнология. 2005; 2: 91–5.
3. Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Барков А.М., Буханцова Л.В. Продукция белков S-слоя разными штаммами *Bacillus anthracis*. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):29–32.
4. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М. Способ получения иммунной сыворотки к антигенам вирулентного штамма *Bacillus anthracis*. Патент № 2252031, опубл. 20.05.2005. Бюл. № 14.
5. Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б. и др. Сибирская язва: ранние этапы внутриклеточной стадии развития инфекции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 4:3–8.
6. Дубровина В.И., Голубинский Е.П., Колесникова О.Б. Показатели неспецифической резистентности морских свинок, иммунизированных *Bacillus anthracis* СТИ-1 и комплексом его антигенов. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1(2):73–6.
7. Леви М.И., Езепчук Ю.В., Немецова М.А. Применение протективного антигена для реакции пассивной гемагглютинации при сибирской язве. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1968; 10:132–4.
8. Ермакова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М. Способ выделения высокомолекулярного соматического сибирезавенного антигена. Патент № 2230570, опубл. 20.06.2004. Бюл. № 17.
9. Меньшов П.И., Шмугер М.Ф. Подбор оптимальных методов формализации эритроцитов для приготовления стойких диагностиков для чумы и бруцеллеза. Пробл. особо опасных инф. 1969; 6:231–2.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.
11. Фримель Г., редактор. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.

12. Buchanan T.M., Feeley J.C., Haues P.S., Brachman P.S. Anthrax in direct hemagglutination test. J. Immunol. 1971; 107:1631–6.
13. Ivins B.E., Ezzell J.W., Jemski J. et al. Immunization Studies with Attenuated Strains of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1986; 52:454–8.
14. Jernigan D.B., Raghunathan P.L., Bell B.P. et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. J. Emer. Infect. Dis. 2002; 8(10):1019–29.
15. Johnson-Winegar A. Comparison of enzyme-linked immunosorbent and indirect hemagglutination assays for determining anthrax antibodies. J. Clin. Microbiol. 1984; 20(3):357–61.
16. Little S.F., Knudson G.B. Comparative Efficacy of *Bacillus anthracis* Live Spore Vaccine and Protective Antigen Vaccine against Anthrax in the Guinea Pig. Infect. Immun. 1986; 52:509–12.

А.М.Барков, И.А.Баркова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, М.Я.Кулаков

## Detection of Antibodies to Protective Antigen of *Bacillus anthracis* Using Indirect Hemagglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Protective antigen, isolated by gel chromatography with the help of sephacril S-300 from the cultural filtrate of *B. anthracis* strain ST1, was used to detect antibodies. Sensitivity of IHA and ELISA with hyperimmune serum to PA corresponded to the titers 1:128000 – 1:256000. Specific activity of IHA with sera of 22 guinea-pigs survived after challenging with *B. anthracis* 81/1, was in titers 1:40 – 1:81920, that of the ELISA – 1:160 – 1:81920. In the sera of anthrax patients antibodies were detected in IHA in titers of 1:20 – 1:20480, in ELISA – 1:800 – 1:12800. The titers of antibodies in paired sera were demonstrated to increase depending on the period of the disease. Specificity of IHA was confirmed by IHIA with PA. Both methods are equally applicable for anthrax diagnosis, however IHA possesses some benefits, i.e. simplicity, rapid performance and registration of the results.

**Key words:** protective antigen (PA), erythrocyte diagnosticum, indirect hemagglutination assay (IHA), indirect hemagglutination inhibition assay (IHIA), solid phase enzyme-linked immunoassay (SPELIA).

### Об авторах:

Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Кулаков М.Я. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

### Authors:

Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Kulakov M.Ya. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 02.02.10.