

А.Е.Хлынцева, Н.М.Лулева, Е.В.Белова, И.А.Дятлов, И.Г.Шемякин

РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЯ ДИАГНОСТИКУМА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПОР ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Проведены исследования по иммобилизации моноклональных антител на твердом носителе (латексных микрочастицах) и подбору оптимальной их нагрузки. Наибольшая чувствительность реакции латекс-агглютинации наблюдалась при использовании моноклональных антител 1Е6. Оптимальная нагрузка моноклональных антител на латексных частицах составила 20 мкг на 50 мкл исходной латексной суспензии. Проведена оценка чувствительности и специфичности лиофильновысушенных латексных суспензий с иммобилизованными МКА. Их чувствительность и специфичность не уступала исходной жидкой латексной суспензии. На их основе сконструирован латексный диагностикум для определения спор возбудителя сибирской язвы, разработан и утвержден комплект нормативной документации, включающий в себя инструкцию по применению и технические условия (ТУ 9388-112-78095326-2010, код ОКП 938890). Проведены межлабораторные и комиссионные испытания экспериментальных образцов сконструированного латексного диагностикума. Полученные препараты характеризуются высокой чувствительностью (от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ спор/мл и выше) и специфичностью (не реагируют со спорами различных видов спорообразующих бацилл в концентрации $1 \cdot 10^8$ спор/мл и ниже).

Ключевые слова: моноклональные антитела (МКА), латексные микрочастицы, реакция латекс-агглютинации (РЛА), чувствительность, специфичность, комиссионные испытания.

A.E.Khlyntseva, N.M.Luneva, E.V.Belova, I.A.Dyatlov, I.G.Shemyakin

Development and Testing of Monoclonal Antibodies-Based Diagnostic Preparation for *Bacillus anthracis* Spores Detection Using Latex Agglutination Method

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Immobilization of anti-*B. anthracis* monoclonal antibodies (MAbs) on latex microparticles was studied, the optimal load of these MAbs was determined to be 20 μ g for 50 μ l of the stock latex suspension. The highest sensitivity of latex agglutination test was observed for 1E6 MAbs. Latex suspensions with immobilized MAbs were lyophilized. Their sensitivity and specificity were shown to be highly competitive with those of the stock liquid latex suspension. Latex diagnosticum for *Bacillus anthracis* spores detection was constructed on the basis of these lyophilized reagents, developed and approved was the regulatory documentation that included their application instructions and technical specifications. Carried out were inter-laboratory and commission tests of experimental prototypes of the designed latex diagnosticum. These preparations demonstrated high sensitivity (from $1 \cdot 10^5$ to $2 \cdot 10^6$ spores/ml and even more) and specificity (absence of cross-reactions with spores of different species of sporogenous bacilli at concentration of 10^8 spores/ml).

Key words: monoclonal antibodies (MAbs), latex microparticles, latex agglutination test, sensitivity, specificity, commission tests.

Сибирская язва является особо опасной инфекцией, поражающей людей и сельскохозяйственных животных, и требует постоянного внимания органов санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора. Подобно другим бациллам, в неблагоприятных условиях бактерии *Bacillus anthracis* образуют споры, которые могут сохраняться в почве в течение нескольких десятилетий, формируя устойчивые природные очаги инфекции.

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 20 тыс. случаев заболевания людей сибирской язвой, нередко с летальным исходом. На территории России и стран СНГ выявлено более 72 тыс. стационарно неблагополучных пунктов, где существуют почвенные очаги инфекции. В настоящее время отмечается активизация многих очагов сибирской язвы, поэтому службы надзора Российской Федерации оценивают санитарно-эпидемиологическую обстановку как напряженную.

Приоритетной задачей лабораторной диагностики сибирской язвы является создание новых достоверных способов детекции спор и вегетативной фор-

мы *B. anthracis* в различных объектах окружающей среды и материале от животных и людей.

К настоящему времени в нашей стране и за рубежом разработано множество экспериментальных иммунодиагностических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы и его антигенов. Однако экспериментальные разработки зачастую не завершаются внедрением результатов в практику на уровне сертифицированных препаратов, как правило, из-за несоответствия принятым параметрам специфичности (неспецифическое взаимодействие с близкородственными видами, такими как *B. cereus* и др. [3]). В связи с этим весьма перспективным представляется конструирование тест-систем, уникальная специфичность которых к спорам возбудителя сибирской язвы обеспечивается особыми свойствами основного иммунореагента – моноклональных антител.

В ходе предыдущих работ нами была получена и охарактеризована панель из 20 гибридных клонов, продуцирующих МКА к спорам возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*, шесть из исследованных

МКА – 4Е6, 2В8, 3Г3, 2С8, 6В6 и 1Е6 специфически взаимодействовали со спорами 16 штаммов возбудителя сибирской язвы и не давали перекрестных реакций со спорами 21 штамма близкородственных бактерий. Результаты по определению констант аффинности МКА показали, что наибольшей аффинностью обладают антитела 1Е6, 6В6 и 3Г3 [1].

Основными параметрами диагностических тест-систем являются их специфичность, чувствительность и воспроизводимость получаемых результатов. Кроме того, существенным показателем является время, затрачиваемое на проведение анализа. Одним из простых и надежных методов детекции возбудителей инфекционных заболеваний является реакция латекс-агглютинации, отличающаяся простотой постановки, возможностью быстрого получения ответа, отсутствием необходимости использования специальных устройств для регистрации результатов при достаточно высокой чувствительности метода. Реакция латекс-агглютинации может быть использована как для качественного, так и для полуколичественного определения инфекционных агентов. Метод основан на специфическом взаимодействии антител, иммобилизованных на твердом носителе (полиакролеиновых микрочастицах), с целевыми микроорганизмами (или их компонентами) с образованием визуально регистрируемого агглютината. Очевидно, что при разработке латексных диагностикумов преимущество должно отдаваться МКА, как более стандартным и высокоспецифичным иммунологическим компонентам [2].

Целью работы являлось конструирование латексного диагностикума на основе отобранных высокоспецифичных МКА для выявления возбудителя сибирской язвы в споровой форме.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовались споры штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*, которые были получены из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ СтавНИПЧИ и ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ, а также из коллекционного центра живых культур ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ. Споры получали при выращивании микроорганизмов на голодном L-агаре. Образование спор оценивали путем просмотра в микроскопе с помощью фазово-контрастного устройства раздавленной или висячей капли, а также мазков, окрашенных по Циллю-Нильсену.

Иммобилизация МКА на латексных частицах. В работе использовались латексные частицы А-63-21 (Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва). Синтезированные монодисперсные акролеиновые частицы имели средний диаметр 1180 нм. К 50 мкл 10 % суспензии латексных частиц добавляли от 10 до 100 мкг МКА. Частицы предварительно дважды от-

мывали 500 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида путем центрифугирования в течение 10 мин при 8000 g. После добавления антител объем раствора доводили до 500 мкл 0,9 % раствором натрия хлорида и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на шейкере. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп к латексным частицам добавляли 4 мл 1 % раствора овальбумина в 0,1 М боратном буфере, рН 8,2. От несвязавшихся МКА латексные частицы отмывали 0,1 М боратным буфером путем трехкратного центрифугирования в течение 10 мин при 1200 g, после чего осадок ресуспендировали в 5 мл 0,1 М боратного буфера (рН 8,2), содержащего 1 % овальбумина.

Постановка реакции латекс-агглютинации. Постановку реакции латекс-агглютинации осуществляли в 96-луночных круглодонных планшетах (Медполимер, Россия). В лунки планшета (кроме первого вертикального ряда) вносили по 25 мкл 0,1 М боратного буфера. В лунки первого и второго вертикальных рядов вносили по 25 мкл взвесей спор убитых культур сибиреязвенного микроба и штаммов гетерологичных микроорганизмов с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Суспензию спор титровали двукратным шагом, начиная со второго вертикального ряда, получая ряд последовательных разведений с концентрацией от $1 \cdot 10^9$ до $5 \cdot 10^5$ м.к./мл. В качестве отрицательного контроля (контроль спонтанной агглютинации) использовали 0,1 М боратный буфер. Далее во все лунки, содержащие споры убитых культур микроорганизмов, и в лунки с отрицательными контролями вносили по 25 мкл приготовленных латексных суспензий с иммобилизованными в определенной концентрации МКА 1Е6, 6В6 и 3Г3. Конечный объем в лунках составил 50 мкл. Непосредственно перед внесением в лунки планшета латексные суспензии хорошо перемешивали. Планшеты слегка встряхивали и инкубировали в течение 1,5–2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Результат учитывали визуально по четырехкрестовой системе: «++++» – агглютинированы все частицы латекса, равномерно покрывая дно лунки и образуя «зонтик»; «+++» – агглютинирована большая часть латексных частиц, что выражается в уменьшении диаметра «зонтика»; «++» – агглютинирована половина латексных частиц; «+» – большая часть латексных частиц не агглютинирована и осела на дно в виде «пуговицы»; «–» – признаков агглютинации нет, все частицы осели на дно в виде «точки». Положительной считается реакция, оцениваемая не менее чем на «++++».

Лиофильное высушивание латексных суспензий с иммобилизованными МКА. Полученные латексные суспензии с иммобилизованными МКА были высушены из замороженного состояния с использованием лиофильной сушки Epsilon 2-4 LSC, («Christ», Германия). Предварительно латексные суспензии были разлиты по 0,5 мл в стеклянные флаконы объе-

мом 4 мл с резиновыми пробками. Высушенные препараты хранили при температуре 4 °С.

Результаты и обсуждение

Работа по конструированию латексного диагностикума для определения спор *B. anthracis* состояла из следующих этапов:

- иммобилизация и подбор оптимальной нагрузки МКА на твердом носителе – латексных микрочастицах (получение латексных суспензий с иммобилизованными МКА);

- проверка чувствительности и специфичности полученных латексных суспензий с иммобилизованными МКА при помощи панели штаммов спор сибирской язвы и гетерологичных микроорганизмов в реакции латекс-агглютинации;

- лиофильная сушка латексных суспензий с иммобилизованными МКА, проверка чувствительности и специфичности высушенных латексных реагентов в реакции латекс-агглютинации;

- изготовление экспериментальных образцов латексных диагностикумов для определения спор возбудителя сибирской язвы;

- проведение межлабораторных и комиссионных испытаний экспериментальных образцов латексных диагностикумов для определения спор возбудителя сибирской язвы.

Для конструирования сибиреязвенного диагностикума предварительно были выбраны МКА 1Е6, 6В6, 3Г3, обладающие высокой аффинностью и специфичностью в отношении спор *B. anthracis*. Данные МКА были получены и охарактеризованы ранее в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)», государственный контракт № 117-Д от 11.06.2009 г.

Для подбора оптимальной нагрузки МКА на латексных частицах была проведена их иммобилиза-

ции с различной концентрацией (10, 20, 40, 60, 80, 100 мкг). Оптимальную нагрузку МКА определяли в реакции латекс-агглютинации, МКА 1Е6, 6В6, 3Г3 – со спорами вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (таблица).

По результатам анализа было установлено, что чувствительность реакции значительно увеличивается при использовании латексной суспензии с иммобилизованными МКА 1Е6 по сравнению с другими антителами. Оптимальная нагрузка на латексных частицах для всех трех моноклональных антител составила 20 мкг/мл на 50 мкл исходной латексной суспензии, дальнейшее увеличение количества МКА не привело к увеличению чувствительности реакции. Таким образом, для разработки сибиреязвенного латексного диагностикума были выбраны МКА 1Е6 с нагрузкой на латексных частицах – 20 мкг МКА на 50 мкл латексной суспензии.

Чувствительность и специфичность сибиреязвенной латексной суспензии оценивали в реакции латекс-агглютинации с инактивированными культурами трех штаммов *B. anthracis* (*B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* М-71, *B. anthracis* М71/12) и четырех гетерологичных штаммов рода *Bacillus* (*B. megaterium* В-1435, *B. cereus* В-160, *B. subtilis* В-1405, *B. licheniformis* В-1411).

В результате проведенного анализа установлено, что полученная латексная сибиреязвенная суспензия с иммобилизованными МКА 1Е6 выявляет исследованные штаммы возбудителя сибирской язвы в концентрациях от $9,8 \cdot 10^5$ до $2,0 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не имеет перекрестной активности с гетерологичными штаммами рода *Bacillus*.

Для увеличения срока годности латексные суспензии были лиофильно высушены. Чувствительность и специфичность лиофильно высушенных латексных суспензий определяли в реакции латекс-агглютинации. Перед началом анализа флаконы с лиофильно высушенными образцами выдерживали в течение 20 мин при комнатной температу-

Подбор оптимальной нагрузки моноклональных антител 1Е6, 6В6, 3Г3 к *B. anthracis* на латексных частицах «А-63-21»

МКА, мкг	МКА	Концентрация спор <i>B. anthracis</i> , спор/мл										
		$5,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^5$	
10	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-	-
20	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
40	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
80	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
100	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-

ре, затем содержимое каждого флакона ресуспендировали в 500 мкл деионизованной воды и тщательно перемешивали.

Постановку анализа и учет результатов реакции проводили как описано выше, за исключением того, что споровые взвеси штаммов *B. anthracis*, близкородственных микроорганизмов рода *Bacillus* и положительный контроль титровали двукратном шагом с начальной концентрации $2,5 \cdot 10^8$ м.к./мл. В качестве положительного контроля использовали жидкую споровую взвесь *B. anthracis* СТИ-1.

В результате проведенного анализа установлено, что лиофильно высушенная сибирезвевная латексная суспензия выявляет исследованные штаммы *B. anthracis* в концентрациях от $9,8 \cdot 10^5$ до $2,0 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не имеет перекрестной активности с близкородственными микроорганизмами рода *Bacillus*, то есть по чувствительности и специфичности определения лиофильно высушенный латексный препарат не уступает исходной жидкой латексной суспензии с иммобилизованными МКА и может быть использован в качестве компонента латексного сибирезвевного диагностикума для определения спор *B. anthracis* (рисунок).

На основании проведенной работы по конструированию латексного диагностикума был разработан и утвержден комплект нормативной документации, включающий в себя инструкцию по применению и технические условия (ТУ 9388-112-78095326-2010, код ОКП 938890).

В набор латексного диагностикума входили: 96-луночный планшет с U-образным профилем лунок для постановки реакции латекс-агглютинации; лиофильно высушенная латексная суспензия с иммобилизованными моноклональными антителами к спорам *B. anthracis* – 5 флаконов; жидкая инактивированная взвесь спор *B. anthracis* СТИ-1

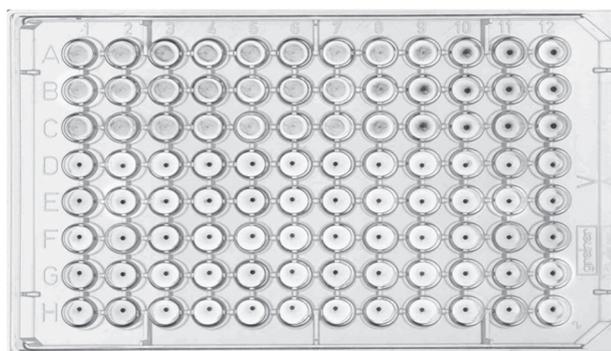
($1 \cdot 10^9$ спор/мл) – 1 флакон; навеска солей (0,34 г борной кислоты, 0,43 г тетрабората натрия) для приготовления 100 мл 0,1 М боратного буфера, pH 8,2.

Для оценки эффективности сконструированных диагностикумов были проведены межлабораторные испытания на базе ФГУН ГНЦ ПМБ и комиссионные испытания на базе Иркутского, Ставропольского и Волгоградского научно-исследовательских противочумных институтов Роспотребнадзора. Для проведения испытаний предоставлялось не менее 5 наборов латексного диагностикума. Подлинность, чувствительность и специфичность латексного диагностикума проверяли путем постановки РЛА с 17 штаммами *B. anthracis* и с 36 штаммами близкородственных бацилл в споровой форме. В результате проведенных испытаний установлено, что «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» обнаруживал споры возбудителя сибирской язвы в концентрации от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не реагировал со спорами различных видов спорообразующих бацилл в концентрации $1 \cdot 10^8$ спор/мл и ниже, за исключением *Bacillus cereus* VRR 569, который выявлен в концентрации $1 \cdot 10^8$, что составило 2,7 %. Ввиду наличия перекрестно реагирующих антигенов у представителей рода *Bacillus*, допускается при проведении РЛА положительный результат с гетерологичными штаммами не более, чем у 10 % от числа исследуемых штаммов.

Таким образом, латексный диагностикум «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» по чувствительности и специфичности соответствует требованиям, предъявляемым к МИБП для идентификации возбудителей особо опасных инфекций. Простота постановки реакции, ее демонстративность, возможность быстрого получения ответа, отсутствие необходимости применения специальных устройств для регистрации результатов является основанием для рассмотрения вопроса о внедрении набора реагентов в практику работы учреждений санэпиднадзора в условиях повседневной деятельности и чрезвычайных ситуаций. Методы контроля, предложенные авторами в технических условиях, воспроизводимы. Показатели качества, полученные в результате контроля, соответствуют требованиям ТУ 9388-112-78095326-2010. Инструкция по применению на представленный набор реагентов включает все необходимые пользователю сведения для воспроизведения предлагаемого способа идентификации спор возбудителя сибирской язвы.

Выражаем благодарность за помощь в проведении работ научным сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ Маринину Л.И.; ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ Храповой Н.П., Баркову А.М., Барковой И.А.; ФКУЗ СтавНИПЧИ Тюменцевой И.С., Жарниковой И.В., Ждановой Е.В.; ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ Кравец Е.В., Дугаржаповой З.Ф.

2,5×10⁸ спор/мл
1,3×10⁸ спор/мл
6,3×10⁷ спор/мл
3,1×10⁷ спор/мл
1,6×10⁷ спор/мл
7,8×10⁶ спор/мл
3,9×10⁶ спор/мл
2,0×10⁶ спор/мл
9,8×10⁵ спор/мл
4,9×10⁵ спор/мл



Оценка чувствительности и специфичности сибирезвевной латексной суспензии после лиофильного высушивания

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Куличенко А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Конструирование тест-системы для селективного концентрирования спор *Bacillus anthracis* на основе магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами. Биотехнол. 2010; 4:81–8.

2. Andreotti P.K., Ludwig G.V., Peruski A.H. et al. Immunoassay of infectious agents. Biotechniques. 2003; 35:850–9.

3. Steichen C., Chen P., Kearney J.F., Turnbough C.L. Identification of the Immunodominant Protein and Other Proteins of the *Bacillus anthracis* Exosporium. J. Bacteriol. 2003; 185:1903–10.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Khlyntseva A.E., Belova E.V., Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Kulichenko A.N., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [Development of the test-

system for the selective concentration of *Bacillus anthracis* spores based on the use of magnet particles with immobilized monoclonal antibodies]. Biotekhnologia. 2010; 4:81–8.

Authors:

Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 03.03.11.