

Н.Е.Терешкина¹, И.В.Терехова¹, Н.А.Сырова¹, З.Л.Девдариани¹, О.Ю.Ляшова¹, Г.В.Григорьева¹,
О.А.Лобовикова¹, И.В.Шульгина¹, И.Л.Иваненко², Н.Б.Захарова², Г.А.Безрукова³, В.Ф.Спирин³

КОНСТРУИРОВАНИЕ И МЕДИЦИНСКИЕ ИСПЫТАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ДОТ-ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА «ДИАТУЛ-М»

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²Центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского», Саратов, Российская Федерация; ³ФБУН «Саратовский научно-исследовательский институт сельской гигиены», Саратов, Российская Федерация

На основе моноклональных антител к липополисахариду *Francisella tularensis* разработана дот-иммуноферментная тест-система для детекции туляреминого микроба «ДИАТул-М». При анализе чистых инактивированных культур 17 штаммов туляреминого микроба разных подвидов и 78 штаммов гетерологичных бактерий, а также контаминированных ими проб плазмы крови, сыворотки крови людей, суспензий органов лабораторных мышей, почвы и воды тест-система «ДИАТул-М» характеризовалась высокой специфичностью в отношении возбудителя туляремии. С микробными клетками гетерологичных бактерий даже в высокой концентрации ($1 \cdot 10^9$ м.к./мл) регистрировалась отрицательная реакция. Чувствительность диагностикума составила $1-5 \cdot 10^6$ м.к./мл. Тест-система обеспечивала получение стабильных результатов после хранения в течение 6 месяцев (срок наблюдения). Медицинские испытания набора реагентов «Тест-система дот-иммуноферментная для детекции туляреминого микроба моноклональная» продемонстрировали перспективность его внедрения в практику российского здравоохранения с возможностью использования как в стационарных, так и в полевых условиях.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, моноклональные антитела, дот-иммуноанализ, иммунодиагностика.

N.E.Tereshkina¹, I.V.Terekhova¹, N.A.Syrova¹, Z.L.Devdariani¹, O.Yu.Lyashova¹, G.V.Grigor'eva¹,
O.A.Lobovikova¹, I.V.Shul'gina¹, I.L.Ivanenko², N.B.Zakharova², G.A.Bezrukova³, V.F.Spirin³

Constructing and Medical Trials of a Monoclonal Dot-Immuno-Enzyme Test-System "DIATul-M" for Tularemia Microbe Detection

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Central Research Laboratory at the Saratov Razumovsky State Medical University, Saratov, Russian Federation; ³Saratov Research Institute of Rural Hygiene, Saratov, Russian Federation

Using monoclonal antibodies to *Francisella tularensis* lipopolysaccharide, designed is a dot-blot immune-enzyme test-system "DIATul-M" for tularemia microbe detection. Its specificity has been tested on 17 strains of tularemia microbe, 78 strains of heterologous bacteria, infected blood plasma samples, human blood sera, suspensions obtained from laboratory mice organs, and soil and water samples. This test system has turned out to be highly specific. "Negative" reaction has been registered even with highly concentrated heterologous bacteria microbial cells – $1 \cdot 10^9$ mc/ml. Sensitivity of the diagnosticum is $1-5 \cdot 10^6$ mc/ml. Additionally, this test-system has been proving for acquisition of sustainable results after 6 months of storing (the observation period). Medical trials of the panel of reagents "Monoclonal dot-immuno-enzyme test-system for tularemia microbe detection" have shown it to be a prospective preparation for implementation into the national healthcare practices both under stationary and field conditions.

Key words: *Francisella tularensis*, monoclonal antibodies, dot immune-enzyme assay, immunodiagnostics.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области лабораторной диагностики туляремии, создание новых препаратов для детекции *Francisella tularensis*, в том числе на основе иммуноферментного анализа (ИФА), не утрачивает актуальности [4].

В нашей стране зарегистрирован набор реагентов «Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) (ИФА-Тул-СтавНИПЧИ)» (производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»), в котором реализуется классический вариант ИФА с использованием специфических поликлональных антител. Тем не менее, разработка альтернативных вариантов ИФА тест-систем представляет значительный практический ин-

терес. Так, дот-вариант иммуноферментного анализа (ДИА), отличающийся от твердофазного ИФА на полистироловых планшетах большей экспрессностью, экономичностью в отношении расхода реагентов, простотой постановки и учета результатов, является весьма эффективным и удобным диагностическим методом.

Важный аспект конструирования современных диагностических препаратов – замена поликлональных иммунореагентов моноклональными, которые можно получить в виде стандартного чистого химического реагента и в практически нелимитированном количестве [3, 8]. Тест-системы на основе моноклональных антител (МКА) приобретают особую ценность в связи со способностью последних вступать

во взаимодействие с уникальным диагностически значимым эпитопом поверхностно расположенного бактериального антигена, что обеспечивает строгую специфичность моноклональных препаратов [3].

Целью настоящего исследования являлась разработка «Тест-системы моноклональной дот-иммуоферментной для детекции туляремийного микроба (ДИАТул-М)», предназначенной для выявления *F. tularensis* в биологическом материале и объектах окружающей среды в сэндвич-варианте ДИА.

Материалы и методы

В качестве твердой фазы в разработанной тест-системе были использованы фильтры мембранные нитроцеллюлозные (ФМНЦ) с диаметром пор 0,2 мкм («Владисарт», Россия). ФМНЦ сенсibilизировали МКА 1D₆ к липополисахариду (ЛПС) *F. tularensis* 15 НИИЭГ, выделенными методом высаливания [5] из асцитических жидкостей зараженных гибридомой *F. tul. 1D₆* мышей инбредной линии BALB/c, в концентрации 10 мкг/мл. Для блокировки свободных сайтов ФМНЦ применяли 0,5 % раствор сухого обезжиренного молока. В готовый набор реагентов вкладывали предварительно сенсibilизированный и заблокированный ФМНЦ.

Образцы материала, содержащего микробные клетки *F. tularensis* и других бактерий, наносили на ФМНЦ в объеме 2 мкл и инкубировали во влажной камере при температуре 37 °С в течение 30 мин. В качестве положительного контрольного образца (ПКО-ТМ) использовали взвесь *F. tularensis* 15 НИИЭГ в концентрации 1·10⁹ м.к./мл, а в качестве отрицательного контроля – 2 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР).

Специфический комплекс антиген–антитело выявляли при помощи МКА 1D₆, конъюгированных с пероксидазой хрена перйодатным методом [2], в рабочем разведении. Хромогенным субстратом служил 3,3'-диаминобензидин («Sigma», Германия).

При постановке ДИА были использованы инaktivированные микробные взвеси 17 штаммов *F. tularensis* и 78 штаммов гетерологичных бактерий (*Brucella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*). Для приготовления смешанных культур бактерий использовали взвеси *Yersinia enterocolitica* 480, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia pseudotuberculosis* II, *Brucella abortus* 19 ВА, *Vibrio cholerae* O139 P16064 в концентрации 1·10⁹ м.к./мл и *F. tularensis* М-80 (природный вирулентный штамм, подвид *holarctica*) в концентрациях 1·10⁶, 5·10⁶ и 1·10⁷ м.к./мл.

Биологическими пробами служили образцы плазмы крови человека, сыворотки крови человека и органов (печени и селезенки) мыши линии BALB/c, объектами окружающей среды – пробы почвы и воды из открытых водоемов. Приготовленные разведения образцов контаминировали *F. tularensis* М-80 в концентрациях 1·10⁶, 5·10⁶ и 1·10⁷ м.к./мл и гетерологич-

ными бактериями в концентрации 1·10⁹ м.к./мл. В качестве отрицательного контроля был использован соответствующий неконтаминированный материал.

Моноклональный туляремийный конъюгат и ПКО-ТМ высушивали под вакуумом с использованием центрифуги-концентратора CentriVar 7310030 (Labconco, США) при температуре 4 °С, скорости вращения ротора 1425 об/мин и давлении 1·10⁻⁴ торр. В качестве стабилизатора к препаратам добавляли 3 % сахарозы. Активность конъюгата до и после высушивания, а также в процессе хранения контролировали постановкой прямого ИФА, а ПКО-ТМ – сэндвич-ДИА.

Все виды материала тестировали с применением экспериментальных серий тест-системы ДИАТул-М, приготовленных *ex tempore*, а также хранившихся в течение 3 и 6 мес.

Учет результатов проводили визуально после высыхания ФМНЦ по наличию или отсутствию на ней окрашенного пятна специфической реакции. Интенсивность окрашивания оценивали в «крестах» по специально разработанной цветовой шкале. За положительный результат принимали окрашивание на 2–4 «креста».

При проведении медицинских испытаний были использованы 2 серии (07 и 08) набора реагентов «Тест-система дот-иммуоферментная для детекции туляремийного микроба моноклональная (ДИАТул-М)», а также набор сравнения «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ». Всего было исследовано 160 образцов чистых культур микроорганизмов, а также биоматериала, проб почвы и воды, контаминированных различными штаммами *F. tularensis* и гетерологичных бактерий.

Результаты и обсуждение

Базовыми иммуореагентами тест-системы «ДИАТул-М» являются МКА к основному диагностически значимому антигену *F. tularensis* – ЛПС [1], что обеспечивает специфичность и стандартность разработанного препарата.

Первоначально тест-систему «ДИАТул-М» применяли для тестирования чистых культур микроорганизмов. Из 17 использованных в работе штаммов *F. tularensis* 13 культур (76,5 %) выявлялись в минимальной концентрации – 5·10⁶ м.к./мл, а 3 штамма (17,6 %) – 1·10⁶ м.к./мл (рисунок). В более низких концентрациях туляремийный микроб не обнаруживался, поэтому в последующих экспериментах *F. tularensis* использовали в 3 концентрациях – 1·10⁶, 5·10⁶ и 1·10⁷ м.к./мл. Из тестированных штаммов бактерий, относящихся к виду *F. tularensis*, не зарегистрировано взаимодействия только со штаммом *F. tularensis novicida* Utah 112. Этот феномен обусловлен, по-видимому, отсутствием в молекуле ЛПС этого микроорганизма эпитопа, комплементарного МКА 1D₆, поскольку данное МКА было получено к ЛПС *F. tularensis* подвида *holarctica*, который отлича-

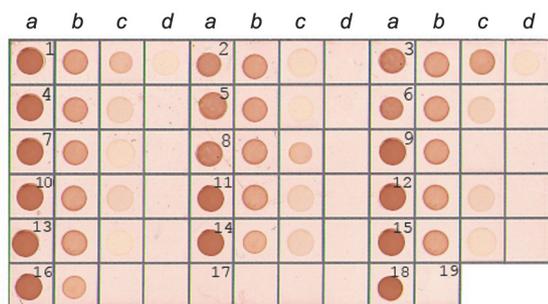


Рис. 1. Исследование в сэндвич-варианте ДИА на основе МКА к ЛПС туляремиального микроба инактивированных чистых культур *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ (1), М-80 (2), М-113 (3), М-498 (4), М-157 (5), А-179 (6), А-61 (7), В-300 (8), Е-261 (9), И-281 (10), И-328 (11), О-328 (12), КФ (13), 38 (14), 74 (15), Koshu (16), Utah 112 (17) в концентрации $1 \cdot 10^7$ (столбец а), $5 \cdot 10^6$ (столбец б), $1 \cdot 10^6$ (столбец с) и $5 \cdot 10^5$ (столбец d) м.к./мл; положительный контроль – ПКО-ТМ (18), отрицательный контроль – ФСБР (19)

ется от подвида *novicida* структурой О-антигена [7]. С микробными клетками гетерологичных бактерий регистрировалась отрицательная реакция.

При исследовании смешанных культур, а также искусственно контаминированного биологического материала, проб почвы и воды с помощью тест-системы «ДИАТул-М» показатель чувствительности совпадал с таковым при тестировании чистых культур. В пределах установленной чувствительности разработанный диагностический набор обладал строгой специфичностью, поскольку положительная реакция отмечалась только с пробами, содержащими туляремиальный микроб.

Для увеличения стабильности и срока хранения биологических субстанций широко используют различные способы приготовления их твердых форм [6], поэтому, после проведения предварительных исследований с жидкими моноклональным туляремиальным конъюгатом и ПКО-ТМ, осуществляли их высушивание под вакуумом. Оказалось, что реакционная способность ПКО-ТМ после высушивания сохранялась. В то же время активность конъюгата снижалась в среднем на 27 %, что нередко отмечается при высушивании белковых препаратов [6]. В течение срока наблюдения (6 мес.) активность высушенных форм реагентов не изменялась, что позволило прийти к заключению о приемлемости включения их в состав тест-системы «ДИАТул-М».

На следующем этапе исследования изучали стабильность скомпонованной тест-системы при хранении. Результаты тестирования проб, аналогичных вышеописанным, с использованием экспериментальных серий тест-систем, хранившихся в течение 3 и 6 мес., полностью коррелировали с таковыми, полученными при применении ФМНЦ и реагентов, приготовленных непосредственно перед постановкой ДИА, что указывало на стабильность препарата в течение срока наблюдения.

В ходе медицинских испытаний было установлено, что «Тест-система дот-иммуноферментная для детекции туляремиального микроба моноклональная

(ДИАТул-М)» позволяет выявлять туляремиальный микроб в биологическом материале от людей и животных, в объектах окружающей среды и чистых культурах в минимальной концентрации $1-5 \cdot 10^6$ м.к./мл при отрицательной реакции с гетерологичными бактериями. При этом туляремиальный микроб был выявлен в концентрации $5 \cdot 10^6$ м.к./мл в 100 % случаев, а в концентрации $1 \cdot 10^6$ м.к./мл – в 6,25 %. При испытании тест-системы «ДИАТул-М» серий 07 и 08 отмечалось допустимое расхождение среди положительных результатов в 7,5–12,5 % случаев в пределах 1 «креста». Расхождения по отрицательным результатам не было.

Не уступая по основным параметрам набору сравнения, тест-система «ДИАТул-М» существенно превосходила его по экономичности расхода реагентов и экспрессности (продолжительность проведения ДИА при анализе 80 образцов была более чем в 2 раза меньше, чем ИФА). Эти преимущества обусловлены выбором для конструирования диагностического препарата точечного варианта ИФА, для которого характерна высокая скорость иммунохимических реакций с использованием микрообъемов ингредиентов для их реализации.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности внедрения разработанного набора реагентов «Тест-система дот-иммуноферментная для детекции туляремиального микроба моноклональная (ДИАТул-М)» в практику российского здравоохранения как в стационарных, так и в полевых условиях за счет возможности визуальной оценки результатов анализа без приборного обеспечения.

Работа выполнена по государственному контракту № 42-Д/1 от 29.06.2012 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. III. Структура О-специфических полисахаридов (Обзор). Биохимия. 1994; 59(12):1784–851.
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. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. В 2-х кн. Т. 1. М.: Мир; 1991. 287 с.
4. Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):12–5.
5. Фримель Г., редактор. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
6. Abdul-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. J. Pharm. Sci. 2007; 96(8):1886–916.
7. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1105:202–18.
8. Peruski A.H., Peruski L.F. Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003; 10(4):506–13.

References

1. Knirel' Yu.A., Kochetkov N.K. [Gram-negative bacteria lipopolysaccharide morphology. III. O-specific polysaccharide structure (Review)]. Biokhimiya. 1994; 59(12):1784–851.

2. Kurmanova L.V., Ermolin G.A., Etkin A.F., Tsvetkov V.S. [Preparation of the specific immune-enzyme conjugates against human immunoglobulins – class A, G, M]. *Lab. Delo.* 1984; 7:402–6.

3. Ketti D., editor. [Antibodies. Methods]. Two volume book. Vol. I. M.: Mir; 1991. 287 p.

4. Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. [Current state of tularemia immunodiagnosics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; (97):12–5.

5. Frimel G., editor. [Immunological Methods]. M.: Meditsina; 1987. 472 p.

6. Abdul-Fattah A.M., Kalonia D.S., Pikal M.J. The Challenge of drying method selection for protein pharmaceuticals: product quality implication. *J. Pharm. Sci.* 2007; 96(8):1886–916.

7. Gunn J.S., Ernst R.K. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1105:202–18.

8. Peruski A.H., Peruski L.F. Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13.

Authors:

Tereshkina N.E., Terekhova I.V., Syrova N.A., Devdariani Z.L., Lyashova O.Yu., Grigor'eva G.V., Lobovikova O.A., Shul'gina I.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Ivanenko I.L., Zakharova N.B. Central Research Laboratory at the Saratov Razumovsky State Medical University. 37, Bol'shaya Sadovaya St., Saratov, 410054, Russian Federation. E-mail: lipidgormon@mail.ru

Bezrukova G.A., Spirin V.F. Saratov Research Institute of Rural Hygiene. 1A, Zarechnaya St., Saratov, 410022, Russian Federation. E-mail: niisgsar@rol.ru

Об авторах:

Терешкина Н.Е., Терехова И.В., Сырова Н.А., Девдариани З.Л., Ляшова О.Ю., Григорьева Г.В., Лобовикова О.А., Шулгина И.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Иваненко И.Л., Захарова Н.Б. Центральная научно-исследовательская лаборатория Саратовского государственного медицинского университета им. В.И.Разумовского. Российская Федерация, 410054, Саратов, ул. Большая Садовая, 37. E-mail: lipidgormon@mail.ru

Безрукова Г.А., Спирин В.Ф. Саратовский научно-исследовательский институт сельской гигиены. Российская Федерация, 410022, Саратов, ул. Заречная, 1А. E-mail: niisgsar@rol.ru

Поступила 06.11.12.