

В.Г.Пушкарь, М.Я.Кулаков

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИММУНОСОРБЕНТОВ С МАГНИТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация

Предложен композиционный магнитный иммуносорбент на основе вермикулита, позволяющий определять с высокой чувствительностью и специфичностью наличие возбудителя сапа в объектах внешней среды. Разработан вариант твердофазного магнитного хемилюминесцентного иммуноанализа проб, содержащих клетки возбудителя сапа. Чувствительность метода для определения клеток возбудителя сапа достигала  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл при сохранении высокой специфичности. Эксперименты по выявлению возбудителя сапа в пробах с садовой почвой позволяют рекомендовать использование композиционных магноиммуносорбентов при мониторинге объектов внешней среды на предмет контаминации различными микроорганизмами и для проведения индикации на зараженность возбудителями особо опасных инфекций.

*Ключевые слова:* магнитный иммуносорбентный хемилюминесцентный анализ.

V.G.Pushkar<sup>2</sup>, M.Ya.Kulakov

### Improvement of Manufacturing Procedure as Regards Immunosorbents with Magnetic Properties for Chemiluminescent Assay

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Put forward is a composite magnetic vermiculite-based immunosorbent that allows for the detection of melioidosis agent in ambient environment objects, characterized by high sensitivity and specificity. Developed is an alternative variant of chemiluminescent enzyme-linked magnetic immunosorbent assay to analyze samples containing melioidosis agent cells. Sensitivity of the technique runs up to  $10^2$  –  $10^3$  mc/ml alongside with high specificity. Additionally, experimental works on melioidosis detection in soil samples has testified to the usage of the composite magnetic immunosorbents for ambient environment monitoring against contamination with various microorganisms and for the purpose of indication of particularly dangerous infection agents.

*Key words:* chemiluminescent enzyme-linked magnetic immunosorbent assay.

Для повышения достоверности и чувствительности различных методов иммуноанализа применяется предварительная концентрация материала в пробах (пробоподготовка). Использование магнитоуправляемых иммуносорбентов (МИС) в твердофазных методах иммуноанализа дает возможность одновременно провести специфическое концентрирование возбудителя и легко отмыть его от загрязнений, используя свойство этих материалов фиксироваться на поверхности в магнитном поле. Ранее нами была разработана технология приготовления магнитных полиакриламидных микрогранул в потоке газообразного азота и на их основе созданы тест-системы выявления антигенов возбудителей особо опасных инфекций различными методами [4, 7].

Целью данной работы стало повышение качества сорбента с магнитными свойствами, а также расширение ассортимента носителей для приготовления иммуносорбентов.

В работе был использован вспученный вермикулит марки 150 (ТУ 2111-001-67642096-2010), получаемый из высокогидратированной биотитовой слюды обжигом при 800–900 °С, который широко применяется в строительстве для повышения теплоизоляционных свойств различных конструкций. Он является сыпучим, легким, биологически стойким, негорючим, экологически чистым и достаточно дешевым

материалом (3000–4000 руб/м<sup>3</sup>). При необходимости его можно размельчить до требуемой степени дисперсности, что позволяет нормировать размеры частиц иммуносорбента. В качестве магнитного материала использовали мелкодисперсную безводную окись железа FeO (ГОСТ 4173-77).

В работе использовали взвеси 24-суточной агаровой культуры *Burkholderia mallei* 10230 и *Burkholderia cepacia* 423 из коллекционного центра ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ, убитые формалином. После контроля стерильности взвеси применяли в опытах для приготовления проб и иммунизации животных при получении иммунных сывороток.

Иммунизацию экспериментальных животных-продуцентов (кроликов и козлов) проводили многократно, циклами из четырех инъекций возрастающих доз антигена в смеси с адьювантом Фрейнда с интервалами в 6–7 дней. Цикл иммунизации повторяли через 3–4 недели. Иммуноглобулины получали из иммунных сывороток трехкратным переосаждением 20 % раствором полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000–7000.

Приготовление магнитного сорбента проводили по разработанной нами методике [6]: вермикулит размельчали до размеров частиц 5–50 мкм, смешивали 1,5 г вермикулита и 2 г магнитного порошка окиси железа, добавляли 10 мл насыщенного раство-

ра коллоидной серы в бензоле. Смесь выдерживали необходимое время и высушивали при температуре 20–25 °С под тягой без нагрева.

Определение оптимального времени инкубации в растворе коллоидной серы проводили по следующей методике: выдерживали 15, 30, 60 и более минут при температуре 20–25 °С и далее полученный сорбент суспендировали в 50 мл 3,5 % раствора декстрана Т-20 в течение 60 мин при температуре 20–25 °С, затем высушивали при температуре 100–110 °С в течение 30 мин. Препарат растирали в ступке или размалывали на мельнице и просеивали через сито с величиной ячеек 130 мкм.

К 200 мг полученного магнитного сорбента добавляли 8 мл 0,2 М раствора перйодата натрия (рН 7,2) и инкубировали на магнитной мешалке при температуре 20–25 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 10 мл 0,64 М раствора этиленгликоля, после чего инкубировали 1 ч при температуре 20–25 °С и промывали трижды 0,1 М раствором фосфатно-солевого буфера (рН 7,2).

К 200 мг активированного магнитного сорбента добавляли 0,5 мл сапных иммуноглобулинов с концентрацией белка 3–4 мг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере при рН 9,5. Взвесь инкубировали в течение 60 мин при температуре 20–25 °С. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок несколько раз промывали 0,15 М раствором хлорида натрия до 0 экстинкции на спектрофотометре. Готовили 10 % суспензию иммуносорбента в том же растворе. Определение специфической емкости проводили методом хемиллюминесцентного анализа в нашей модификации.

В опытные и контрольные пробирки вносили по 0,05 мл 10 % суспензии приготовленных сапных магнитных иммуносорбентов, затем в опытные пробирки вносили по 0,05 мл взвеси клеток возбудителя сапа в концентрациях от  $10^7$  до  $10^2$  м.к./мл, а в контрольные пробирки – по 0,05 мл промывочного раствора. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Удаляли надосадок из пробирок и трижды отмывали промывочным раствором, используя для седиментации постоянный магнит. Во все пробирки вносили по 0,05 мл рабочего раствора конъюгата пероксидазы хрена со специфическими иммуноглобулинами, в который предварительно был добавлен бычий сывороточный альбумин из расчета 10 мкг на 1 мл. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин, удаляли надосадок из пробирок и отмывали промывочным раствором 5–6 раз. Во все пробирки вносили по 0,05 мл 1 % раствора люминола и по 0,05 мл перекиси водорода в разведении 1:1000 и проводили измерение на люминометре 1250 (ЛКВ, Швеция). Специфическую емкость выражали в условных единицах (у.е.) – отношение уровня полезного сигнала при максимальном насыщении матрицы специфическим антигеном к уровню контроля. В качестве контроля использовали тот же иммуносорбент без его инкубации со специфическим антигеном. На всех этапах отделение им-

муносорбента из жидкости проводили методом седиментации при помощи постоянного магнита.

В результате выполнения работы нами был предложен способ приготовления магнитных иммуносорбентов на основе вермикулита с использованием серы.

При определении оптимального времени инкубации иммуносорбента в растворе коллоидной серы было установлено снижение его качественных характеристик при экспозиции 15 и 30 мин. Так, специфическая емкость иммуносорбента снижалась до 7 у.е., а чувствительность ухудшалась до  $10^4$  м.к./мл. Увеличение времени инкубации более 60 мин не изменяло характеристик иммуносорбента и поэтому оказалось нецелесообразным. Таким образом, оптимальное время инкубации матрицы в растворе коллоидной серы составило 60 мин.

Предложенные иммуносорбенты были использованы в модифицированном нами хемиллюминесцентном методе, который позволил определять клетки сапного микроба в более низких концентрациях, чем в традиционном твердофазном иммуноферментном анализе с использованием полистироловых планшетов. Результаты измерений показали, что чувствительность описанного метода для определения клеток возбудителя сапа достигала  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл при сохранении высокой специфичности. Добавление в пробу суспензии садовой почвы (до 10 %) практически не влияло на результаты измерений. Соотношение уровня полезного сигнала к контрольному при насыщении матрицы гомологичным антигеном достигало 9–11 у.е.

Определение клеток сапного микроба описанным методом проводили трижды для каждой концентрации, и полученные результаты обрабатывали статистически. Сравнение с известными носителями для магнитного иммуноанализа позволило сделать вывод о том, что предложенные МИС обладают высокими иммунохимическими характеристиками как по чувствительности, так и по специфической емкости. Проведенные эксперименты по выявлению возбудителя сапа в пробах с садовой почвой позволяют рекомендовать их для практической работы по мониторингу объектов внешней среды на предмет контаминации различными микроорганизмами и для проведения индикации на зараженность возбудителями особо опасных инфекций.

Использование композиционных сорбентов повышает специфичность препаратов, тем самым повышая надежность и достоверность эпидемиологического обследования объектов внешней среды на содержание инфекционных агентов, в том числе возбудителей особо опасных инфекций. При этом в 1,5–2 раза повышается уровень специфической активности по сравнению с ранее предложенными магнитными иммуносорбентами, описанными в литературе [3].

Перспективность выбранного направления подтверждается разработками других НИИ, в частности Ставропольским НИПЧИ, где успешно проводятся

научно-исследовательские работы по совершенствованию МИС и методик работы с ними в различных видах иммуноанализа, в том числе по мониторингу возбудителей опасных бактериальных и вирусных заболеваний в объектах внешней среды [1, 2]. Выступая в качестве твердой фазы, магнитные сорбенты нашли применение в иммунофлуоресцентном, иммуноферментном, радиоиммунном анализе, а также для селективного концентрирования материала в молекулярно-генетических (ПЦР) и других видах анализов [5].

Магнитоуправляемые иммуносорбенты, сохраняя возможность активного концентрирования материала, позволяют легко решить проблему их отделения из реакционных сред, сокращают время проведения иммунохимических анализов за счет эффективного перемешивания твердой фазы в переменном магнитном поле. Это, в свою очередь, открывает новые перспективы для использования средств современной автоматики, способной повысить достоверность и чувствительность твердофазных методов иммуноанализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко В.И., Львов Д.К., Жарникова И.В., Василенко Н.Ф., Дерябин П.Г., Левченко Н.В., Антоненко А.Д., Орлова Т.Н., Исаева Е.И., Ботиков А.Г., Таран А.В., Жарникова Т.В. Диагностическая тест-система для выявления вируса гриппа птиц А/Н5N1. Патент 2339694 РФ, опублик. 27.11.08 г. Бюл. № 33.
2. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Жданова Е.В., Жарникова Т.В. Афанасьева Е.Е., Орлова Т.Н., Ефременко Д.В., Афанасьев Н.Е., Лаврешин М.П., Левченко Н.В., Семирчева А.А., Курчева С.А., Бабий А.М. Разработка и применение иммобилизованных систем для экспресс-диагностики различных заболеваний. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2008; 2(22):180–4
3. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев В.И., Бинатова В.В. Способ получения иммуносорбента (варианты). Патент 2138813 РФ, опублик. 27.09.99 г. Бюл. № 21.
4. Климова И.М., Ефременко В.И., Пушкарь В.Г. Магнитный

иммуноферментный анализ антигенов *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол.* 1989; 7:62–6.

5. Левченко Н.В., Ефременко В.И. Экспресс-диагностика вируса гриппа птиц в объектах окружающей среды, содержащих патоген в низких концентрациях. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2011; 1(21): 46–9.

6. Пушкарь В.Г., Тихонов Н.Г., Васильев В.П., Климова И.М. Способ получения иммуносорбента. Патент 2192013 РФ, опублик. 27.10.02 г. Бюл. № 30.

7. Пушкарь В.Г., Ефременко В.И., Климова И.М., Гавенский С.Д., Трофимов Е.Н. Приготовление и применение магнитных сорбентов для изучения антигенов микроорганизмов. *Журн. микробиол. эпидемиол и иммунобиол.* 1985; 12:30–5.

#### References

1. Efremenko V.I., L'vov D.K., Zharnikova I.V., Vasilenko N.F., Deryabin P.G., Levchenko N.V., Antonenko A.D., Orlova T.N., Isaeva E.I., Botikov A.G., Taran A.V., Zharnikova T.V. [Diagnostic test-system for avian flu virus (A/H5N1) detection]. RF Patent 2339694.
2. Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Efremenko V.I., Zhdanova E.V., Zharnikova T.V., Afanas'eva E.E., Orlova T.N., Efremenko D.V., Afanas'ev N.E., Lavreshin M.P., Levchenko N.V., Semircheyeva A.A., Kurcheva S.A., Babii A.M. [Development and implementation of immobilized systems for rapid express-diagnostics of various diseases]. *Vest. Ros. Voenno-Med. Akad.* 2008; 2(22): 180–4.
3. Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Efremenko V.I., Afanas'ev V.I., Binatova V.V. [Method of immunosorbent manufacturing (variants)]. RF Patent 2138813.
4. Klimova I.M., Efremenko V.I., Pushkar' V.G. [Magnetic immunosorbent analysis of *Yersinia pestis* antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1989; 7:62–6.
5. Levchenko N.V., Efremenko V.I. [Express-diagnostics of avian flu virus in ambient environment objects containing the pathogen in low amounts]. *Medits. Vestnik Severn. Kavkaza*. 2011; 1(21):46–9.
6. Pushkar' V.G., Tikhonov N.G., Vasil'ev V.P., Klimova I.M. [Method of immunosorbent production]. RF Patent 2192013.
7. Pushkar' V.G., Efremenko V.I., Klimova I.M., Gavensky S.D., Trofimov E.N. [Production and application of magnetic immunosorbents for studies of microorganism antigens]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 12:30–5.

#### Authors:

Pushkar' V.G., Kulakov M.Ya. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

#### Об авторах:

Пушкарь В.Г., Кулаков М.Я. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.10.13.

*Редакционный совет и редакционная коллегия  
научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют*

#### *с 85-летием*

*Адамова Алексея Константиновича – доктора медицинских наук, профессора,  
главного научного сотрудника лаборатории патогенных вибрионов Российского  
научно-исследовательского противочумного института «Микроб»*

#### *с 75-летием*

*Попова Вячеслава Петровича – зоолога высшей квалификационной категории  
эпидемиологического отдела Противочумного центра Роспотребнадзора*

*и желают им больших творческих успехов, здоровья и благополучия*