

УДК 616.98:579.852.11

Л.Ю.Аксенова, А.Г.Рязанова, Е.В.Жданова, О.И.Цыганкова, Н.П.Буравцева, Е.И.Еременко,  
И.С.Тюменцева, О.И.Коготкова, А.А.Зуенко, А.Н.Куличенко

### РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ НЕПРЯМЫМ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь,  
Российская Федерация

Разработана и апробирована тест-система для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител. Набор включает в себя антигенный препарат, положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец, ФИТЦ-конъюгат кроличьих антител. Изучены 10 акапсульных штаммов *B. anthracis* с различным плазмидным составом и морфологией колоний. Установлено, что в качестве антигенного препарата оптимальным является вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1. Чувствительность данной тест-системы по диагностическому титру составляет не менее 1:40 при рабочем разведении ФИТЦ-конъюгата 1:16. Специфичность набора изучали на 100 сыворотках здоровых доноров. Установлено, что 3 % сывороток имели специфическое свечение на 3+ в диагностическом разведении. Подтверждена 100 % воспроизводимость данного метода в разные временные сроки, а также при проведении исследования разными специалистами. Сконструированная тест-система позволяет подтвердить диагноз сибирской язвы у людей.

*Ключевые слова:* *Bacillus anthracis*, тест-система, сибирская язва, антитела.

L.Yu.Aksenova, A.G.Ryazanova, E.V.Zhdanova, O.I.Tsygankova, N.P.Buravtseva, E.I.Eremenko,  
I.S.Tyumentseva, O.I.Kogotkova, A.A.Zuenko, A.N.Kulichenko

### Construction and Approval of the Test-System for the Detection of Antibodies to Anthrax Agent Using Indirect Fluorescent Immunoassay

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Constructed and validated has been the test-system for the detection of antibodies to anthrax agent using indirect fluorescent immunoassay. The panel consists of antigen preparation, positive control sample, negative control, and FITS-labeled rabbit antibodies. Studied have been 10 acapsular *B. anthracis* strains with different plasmid content and colony morphology. *B. anthracis* vaccine strain STI-1 is demonstrated to be the optimal one as antigen preparation. Sensitivity of this test-system is not less than 1:40, the working dilution of FITC-conjugate being 1:16. Specificity of the panel has been studied using 100 sera of healthy donors. Approved is 100 % reproducibility of the technique at different time intervals, as well as when carried by different specialists. The test-system allows for confirmation of anthrax diagnosis in humans.

*Key words:* *Bacillus anthracis*, test-system, anthrax, antibodies.

Эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Российской Федерации продолжает оставаться напряженной [1]. Наиболее часто вспышки этой инфекции среди животных и, как следствие, заболевания людей встречаются в субъектах Южного, Северо-Кавказского, Приволжского, Сибирского федеральных округов. Выделить культуру возбудителя от больных кожной формой сибирской язвы людей затруднительно, изоляты *Bacillus anthracis* получают в среднем лишь в 31 % случаев [2].

В соответствии с действующими методическими указаниями МУ 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» в тех случаях, когда не удастся выделить культуру возбудителя для постановки диагноза этой инфекции у человека при наличии соответствующей клинической картины и эпидемиологического анамнеза, необходимо проведение генетических (ПЦР) и иммунологических (ИФА, МФА) методов исследования.

Однако ввиду отсутствия зарегистрированных отечественных диагностических тест-систем для МФА и ИФА эти методы не включены в перечень тех, которыми можно лабораторно подтвердить диагноз сибирской язвы у человека. Все это делает актуальным разработку и производство набора для выявления антител в сыворотке крови людей непрямым методом флуоресцирующих антител (нМФА).

Целью работы явилась разработка и конструирование тест-системы для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител в сыворотке крови людей.

Метод основан на иммунохимической реакции антигена со специфическими антителами, содержащимися в исследуемых сыворотках. В качестве антигена используется убитая вегетативная культура вакцинного штамма сибиреязвенного микроба. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляют *in vitro* с помощью флуоресцеинизотиоцио-

ната (ФИТЦ)-конъюгата кроличьих антител против иммуноглобулинов человека.

Индикаторный штамм должен обладать следующими свойствами: наличие полного состава комплекса антигенов (особенно поверхностных), отсутствие раннего спорообразования, типичность морфологии бактериальных клеток. Учитывая это, были апробированы 10 акапсульных штаммов *B. anthracis* с различным плазмидным составом и морфологией колоний: СТИ-1; СТИ-с – вариант штамма СТИ-1, растущий в S-форме; ΔСТИ – бесплазмидный вариант штамма СТИ-1; 228/4 – бесплазмидный вариант штамма 228; 228/8; 228/8-2 – вариант штамма 228/8, растущий в S-форме; 55; Sterne 34F<sub>2</sub>; ΔSterne – бесплазмидный вариант Sterne 34F<sub>2</sub>; Ихтиман. Наилучшие результаты были получены со штаммами СТИ-1, 228/8, Ихтиман, у которых отмечалось специфическое свечение бактериальных клеток при использовании иммунной сыворотки людей, больных кожной формой сибирской язвы, в разведениях 1:160, 1:320. В мазках со штаммами СТИ-с, 228/4, 228/8-2, 55, Sterne, ΔSterne, ΔСТИ специфическое свечение на 3–4+ наблюдалось в разведениях 1:80, 1:160, кроме того, в мазках с культурой ΔSterne отмечались единичные споры.

В дальнейшем отобранные штаммы СТИ-1, 228/8, Ихтиман культивировали на различных средах выращивания: агаре Хоттингера, агаре Хоттингера с добавлением 5 % дефибринированной крови барана, питательном агаре на основе Brain Heart Infusion, бикарбонатно-сывороточном агаре. Существенного различия при использовании различных сред выращивания не выявилось, специфическое свечение на 3–4+ наблюдалось в разведениях 1:160, 1:320 при культивировании на всех питательных средах. Следует отметить небольшое преимущество агара Хоттингера с добавлением 5 % дефибринированной крови барана. При этом морфология бактериальных клеток в мазках с культурой Ихтиман была менее типичной (отсутствие нитей) по сравнению с культурой СТИ-1.

Таким образом, при конструировании тест-системы нМФА нами был отобран вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1.

Имуноглобулины класса G (IgG) выделяли каприловым методом из сыворотки крови человека, концентрировали полиэтиленгликолем-6000 до 20 мг/мл по белку, доводили pH до 4,4 1 М раствором соляной кислоты и проводили связывание IgG 2,5 % глутаровым альдегидом. Полученные полимеризованные иммуноглобулины измельчали в 10 мл фосфатного буферного раствора в гомогенизаторе. От несвязавшегося белка осадок отмывали последовательно в трехкратном объеме глицин-HCl (0,1 М) буферном растворе pH (2–3), далее в таком же объеме глицин-NaOH (0,1 М) буферном растворе pH (8±0,1) и в фосфатно-солевом буфере 0,01 М концентрации с 0,15 М раствором натрия хлорида pH (7,6±0,05). Отмывку от несвязавшегося белка контролировали на спектрофотометре при длине волны 280 нм.

Для получения кроличьих сывороток против IgG человека использовали схему иммунизации с применением иммуномодуляторов тималина и циклофосфана. Первые три инъекции проводили полимеризованными IgG в паховую область по 0,5 мл каждому кролику и по 1 мл тималина внутримышечно, при третьей инъекции дополнительно вводили по 1 мл циклофосфана внутримышечно. Через 30 дней кроликам-продуцентам трижды вводили внутривенно интактные IgG с концентрацией белка 15 мг/мл. В основу схемы иммунизации положена методика И.С.Тюменцевой [3].

На 8–9-е сутки после последней инъекции проводили пробное взятие крови и определение активности иммунных сывороток методом двойной иммунодиффузионной преципитации в геле по Оухтерлони. Титр полученных сывороток составлял 1:16–1:32. После кровопускания из сывороток выделяли иммуноглобулины каприловым методом, концентрируя их до 20 мг/мл. Конъюгацию с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) осуществляли при pH (9,5±0,1) из расчета 20,0 мг красителя на 1 г белка.

Очистку конъюгата от несвязавшегося ФИТЦ проводили геле-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50. При очистке конъюгата собирали фракции первого пика, определяли концентрацию белка и молярное отношение ФИТЦ/белок спектрофотометрическим методом при двух длинах волн 280 нм и 495 нм, используя разведение конъюгата 1:50 и 1:100. Оптимальная концентрация белка конъюгата – (10±1) мг/мл, M<sub>ф</sub>/M<sub>о</sub> – 3–5.

Полученный препарат разливали в ампулы, замораживали до (–40±1) °С и лиофилизировали на сушильной установке ЛС-500.

Для определения срока хранения приготовленных фиксированных и обеззараженных мазков их хранили при 4 °С (±1) в течение 18 мес. Установлено, что мазки с культурой *B. anthracis* СТИ-1 в течение срока наблюдения сохраняли исходное качество – контрольные положительные сыворотки обеспечивали свечение сибиреязвенных микробных клеток на 4+ в диагностических титрах.

В качестве положительного контрольного образца использовали сыворотки, полученные от больных сибирской язвой во время вспышек данной инфекции в 2010 г. в Чеченской Республике и Республике Дагестан. Перед исследованием сыворотки крови обеззараживали добавлением мертиолатата натрия до концентрации 1:10000, инактивировали на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин, лиофилизировали и запаивали в ампулы.

Для изучения специфичности тест-системы было использовано 100 сывороток здоровых доноров, предоставленных Ставропольской краевой станцией переливания крови. Сыворотки крови также обеззараживали, инактивировали, лиофилизировали и запаивали в ампулы. В работе использовали сыворотки в разведениях 1:20 и 1:40.

В результате установлено, что три сыворотки доноров давали положительную реакцию со свечением 3+ в разведениях 1:20 и 1:40. При исследовании остальных сывороток свечения не наблюдалось. Специфичность тест-системы составила 97 %. Контрольная положительная сыворотка в диагностическом титре 1:40 обеспечивала специфическое свечение на 4+.

Чувствительность метода по диагностическому титру не менее 1:40 при рабочем разведении ФИТЦ-конъюгата не менее 1:16. При его апробации в разные временные сроки, при проведении исследования разными специалистами получены идентичные результаты, т.е. метод одинаково воспроизводим.

Разработанный набор реагентов иммунофлуоресцентной тест-системы включает в себя следующие компоненты:

- антигенный препарат – предметные стекла, на поверхность которых нанесены по 8 фиксированных мазков 18-часовой вегетативной культуры вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1;

- положительный контрольный образец – сыворотка крови реконвалесцента, содержащая антитела против возбудителя сибирской язвы, обеззараженная, инактивированная, лиофилизированная;

- отрицательный контрольный образец – сыворотка крови человека, не содержащая антитела против возбудителя сибирской язвы, инактивированная, лиофилизированная;

- ФИТЦ – конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов человека;

- инструкция по применению.

На сконструированную тест-систему разработаны нормативные документы (инструкция по применению, технические условия, образцы внешней и внутренней маркировки), проведены внутрилабораторные и межлабораторные испытания.

Таким образом тест-система для определения антител к возбудителю сибирской язвы непрямым методом флуоресцирующих антител специфична, проста в обращении, имеет срок годности не менее года и может быть рекомендована для лабораторной диагностики сибирской язвы у людей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Аксенова Л.Ю., Цыганкова О.И., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Куличенко А.Н. Анализ заболеваемости сибирской язвой в 2011 г. и прогноз на 2012 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):37–9.
2. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2008. 416 с.
3. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Базиков И.А., Алиева Е.В. Способ получения диагностической сыворотки. Патент № 213510 РФ, опубл. 27.08.99 г. Бюл. № 24.

#### References

1. Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova E.A., Aksenova L.Yu., Tsygankova O.I., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Kulichenko A.N. [Analysis of the anthrax morbidity rate in the Russian Federation in 2011, and prognosis for 2012]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111): 37–9.
2. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V., Nikiforov V.V. [Human Anthrax: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment]. М.: ЗАО МП “Gigiena”; 2008. 416 p.
3. Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Efremenko V.I., Bazikov I.A., Alieva E.V. [Method of diagnostic serum production]. RF Patent 213510.

#### Authors:

Aksenova L.Yu., Ryazanova A.G., Zhdanova E.V., Tsygankova O.I., Buravtseva N.P., Eremenko E.I., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Zuenko A.A., Kulichenko A.A. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жданова Е.В., Цыганкова О.И., Буравцева Н.П., Еременко Е.И., Тюменцева И.С., Коготкова О.И., Зуенко А.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 24.04.13.