

Л.А.Башарова, С.П.Ярков, С.И.Третьяков, В.Н.Злобин

## СОЗДАНИЕ ИНДИКАТОРНЫХ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РИККЕТСИЙ БЕРНЕТА

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация

Целью работы явилась разработка иммунохроматографических индикаторных элементов (ИЭ) для экспресс выявления риккетсий Бернета. В качестве антител захвата при построении иммунохроматографического анализа использовали кроличьи IgG к коксиеллам Бернета, выделенные из гипериммунной сыворотки кроликов спиртовым фракционированием по Кону и дополнительно очищенные аффинной хроматографией с использованием белка А. Антигеном служили инактивированные клетки коксиелл Бернета, штамм «Желтогорлая мышь-Луга». Иммунохроматографический анализ был построен в формате «сэндвич» с использованием вспомогательных и аналитических мембран «Миллипор». В результате проведенных исследований разработаны ИЭ для выявления риккетсий Бернета с чувствительностью  $1 \cdot 10^6$  м.к./мл и временем анализа – 20 мин. ИЭ специфичен также по отношению к риккетсиям Провачека, антигенным комплексам риккетсий Провачека и риккетсий Сибирика в концентрации 8 АЕ/мл, а также вирусу осповакцины (штамм Л-ИВП). Разработанные ИЭ могут быть использованы для экспресс-индикации риккетсий Бернета на различных стадиях лабораторного исследования. Короткое время анализа, отсутствие дополнительных технологических операций, визуальная и (или) приборная регистрация позволяют рассматривать иммунохроматографический метод выявления риккетсий Бернета как один из вариантов выявления этих микроорганизмов в полевых условиях, при мониторинге объектов окружающей среды.

*Ключевые слова:* иммунохроматография, выявление, *Coxiella burnetii*.

L.A.Basharova, S.P.Yarkov, S.I.Tret'yakov, V.N.Zlobin

### Construction of Immune-Chromatographic Indicator Elements for Burnet Rickettsia Detection

State Research Institute for Biological Instrumentation Engineering of the Federal Medical-Biological Agency,  
Moscow, Russian Federation

Objective of the research was to construct immune-chromatographic indicator elements (IE) for rapid Burnet Rickettsia detection. Rabbit IgGs to *Coxiella burnetii* isolated from hyperimmune rabbit sera using Cohn fractionation and further purified by means of affinity chromatography with A-protein were used as capture antibodies during the process of immune-chromatographic assay development. Inactivated cells of *Coxiella burnetii*, “Yellow-necked mouse – Luga” strain, performed the role of the antigen. Immune-chromatographic assay was plotted in a “sandwich” format with application of accessory and analytical membranes “Millipore”. Based on the investigations conducted, developed were the IEs for Burnet Rickettsia detection, their sensitivity being of  $1 \cdot 10^6$  mc/ml, and the elapsed time – 20 minutes. The IE is specific to other members of the family *Rickettsiaceae*, for instance to *R. prowazekii*, to antigen complexes of *R. prowazekii* and *R. sibirika*, as well as to vaccinia virus (L-IVP strain). The IE engineered can be used for rapid indication of Burnet Rickettsia at different stages of laboratory investigation. Span time reduction, lack of necessity to perform any accessory technological operations, visual and (or) automatic registration of the results build up premises to observe immune-chromatographic method for Burnet Rickettsia detection as one of the alternatives for identification of these microorganisms under field conditions when monitoring ambient environment objects.

Key words: immune-chromatography, detection, *Coxiella burnetii*.

Риккетсии Бернета (*Coxiella burnetii*) относятся к внутриклеточным микроорганизмам семейства риккетсий (*Rickettsiaceae*), рода *Coxiella* [2, 3], вызывающим лихорадку Ку – острую инфекционную болезнь с полиморфной клинической картиной, что затрудняет диагностику и клиническую дифференциацию лихорадки Ку с другими инфекционными болезнями, такими как брюшной тиф, бруцеллез, пневмонии различной этиологии, аденовирусные инфекции, туберкулез. Решающее диагностическое значение имеют серологические тесты, с помощью которых выявляют специфические антитела у больных. Для серологической диагностики наиболее широко используют реакцию агглютинации (РА), реакцию связывания комплимента (РСК) и реакцию прямой иммунофлуоресценции (РНИФ) [1, 6].

Эпидемической особенностью лихорадки Ку, по сравнению с другими риккетсиозами, является множественность резервуаров и источников инфекции

в природе, а также множественность путей передачи возбудителя человеку от источника инфекции – аэрогенным путем, через воду, пищевые продукты. Возбудитель относится к необычно устойчивым микроорганизмам во внешней среде, а также к различным физическим и химическим воздействиям [3].

Учитывая сказанное выше, выявление риккетсий Бернета в объектах окружающей среды представляет актуальную задачу. Обнаружение возбудителя инфекции по схеме специфической индикации осуществляется при помощи табельных методов – метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой гемагглютинации эритроцитов (РНГА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) [3]. Иммунохроматографические экспресс-методы индикации риккетсий Бернета в нашей стране до настоящего времени отсутствовали.

Целью настоящей работы явилась разработка иммунохроматографического индикаторного элемен-

та (ИЭ) для выявления риккетсий Бернета в объектах окружающей среды.

### Материалы и методы

В работе использовали кроличьи поликлональные антитела (ПКА) класса IgG, выделенные спиртовым фракционированием по Кону из гипериммунной сыворотки кроликов породы шиншилла, иммунизированных клетками *S. burnetii* штамм «Желтогорлая мышь-Луга». Титр ПКА в РНИФ составил 1:2560. ПКА подвергали дополнительной очистке методом колоночной аффинной хроматографии на агарозе с использованием белка А. Использовали колонки производства фирмы Pall (США).

В качестве антигена использовали инактивированные формальдегидом клетки риккетсий Бернета штамм «Желтогорлая мышь-Луга», полученные из селезенки инфицированных беспородных белых мышей. Выделение риккетсий осуществляли путем растирания селезенки в ступке с 0,9 % раствором формальдегида на 1 % растворе хлорида натрия из расчета 1 мл на 1 селезенку. Для повышения выхода риккетсий из клеточного материала исходную суспензию подвергали трехкратному замораживанию до  $-40^{\circ}\text{C}$  и оттаиванию. Антиген отделяли от клеточного детрита центрифугированием. Концентрация антигена, определенная по стандарту мутности, составила  $1 \cdot 10^{10}$  м.к./мл. Антигенный материал риккетсий и спиртовая фракция ПКА к ним были получены из научно-исследовательского и испытательного центра медико-биологической защиты «ГосНИИИ военной медицины» Минобороны России. Готовили десятикратные разведения суспензии риккетсий в диапазоне концентраций  $10^5$ – $10^8$  м.к./мл в разводящем буфере состава – 0,1 М ФБ рН 7,8 с 0,5 % БСА и 0,4 % твин-20.

Для изучения специфичности разработанных ИЭ использовали риккетсии Провачека (ФС 42-3930-00), АГ риккетсий Сибирика или Провачека, представляющие собой лиофилизированные антигенные комплексы, выделенные путем эфирной обработки риккетсий, выращенных в желточных мешках развивающихся куриных эмбрионов и инактивированных фенолом («НПО «Микроген»), и осповакцину штамма Л-ИВП, ФСП 42-05041124-04 (НПО «Вирион»).

Изготовление ИЭ осуществляли согласно схеме, описанной нами ранее [4]. Наночастицы коллоидного золота для конъюгирования с антителами получали восстановлением 0,01 % раствора золотохлористоводородной кислоты  $\text{HAuCl}_4$  цитратом натрия [8]. Стабилизирующую концентрацию иммуноглобулинов для полученного золя золота, соответствующую точке адсорбционного насыщения поверхности частиц золя данными антителами, определяли визуально по агрегации и выпадению в осадок частиц золя [7]. Аналитическую зону ИЭ формировали из IgG против риккетсий Бернета, а контрольную зону – из антител козы против иммуноглобулинов кролика (КозАК). Регистрацию аналитического эффекта проводили как визуально, так и с помощью отече-

ственного видеоцифрового анализатора иммунохроматограмм «Рефлеком» (ООО «Синтеко-Комплекс»), внесенного в государственный реестр средств измерений России [5]. Прибор регистрировал величину окрашивания аналитической и контрольной зон ИЭ в условных единицах. Измерения для каждой концентрации микробных клеток и отрицательных контролей проводили пятикратно, вычисляли среднее арифметическое и определяли погрешность измерения с использованием коэффициентов Стьюдента ( $t_p=2,78$  при  $n=5$ ) с 95 % надежностью.

### Результаты и обсуждение

Сконструированный нами ИЭ для выявления риккетсий состоял из аналитической мембраны с присоединенными подложками разного вида, соединенных в мультимембранный композит. На аналитическую мембрану были нанесены в виде тонких линий растворы специфических к риккетсиям антител (в аналитическую зону ИЭ) и КозАК (в контрольную зону ИЭ). Мультимембранный композит помещали в пластиковую оправку с круглым отверстием для внесения образца и прямоугольным отверстием для считывания результатов анализа. Жидкий образец, нанесенный на ИЭ, содержащий суспензию риккетсий, под действием капиллярных сил начинал перемещаться по подложке для впитывания образца, далее смывал с конъюгатной подложки конъюгат наночастиц золя золота со специфическими антителами. При этом образовывался окрашенный иммунный комплекс, который с током жидкости перемещался по аналитической мембране. Иммунный комплекс задерживался специфическими антителами, нанесенными в аналитической зоне аналитической мембраны, что приводило к образованию окрашенной в красно-вишневый цвет линии. Часть иммунного комплекса и несвязавшийся конъюгат продвигались по аналитической мембране до контрольной зоны, где антивидовые антитела образовывали иммунный комплекс с антителами конъюгата. Образование такого комплекса визуально проявлялось в образовании окрашенной линии в контрольной зоне и свидетельствовало об иммунохимической активности конъюгата. Если в образце риккетсии Бернета отсутствовали, либо их концентрация была ниже чувствительности ИЭ, то окрашенная линия в аналитической зоне не образовывалась. Это соответствовало отрицательному результату анализа и такой ИЭ считался непригодным, а результаты анализа, полученные с его помощью, не учитывались.

При регистрации результатов иммунохроматографического анализа визуально различимая четкая полоса красно-вишневого цвета в аналитической зоне ИЭ соответствовала показаниям прибора «Рефлеком» ( $2,30 \pm 0,02$ ) усл.ед. и более, а интенсивность окрашивания аналитической зоны в отрицательном контроле (визуально воспринимаемое как отсутствие окрашивания) не превышала ( $1,10 \pm 0,04$ ) усл.ед. Интенсивность окрашивания аналитической зоны ИЭ была пропорциональна концентрации риккетсий в анализируемых растворах (таблица).

Чувствительность и специфичность ИЭ для выявления риккетсий Бернета

Наименование препарата	Концентрация	Визуальная оценка интенсивности окрашивания аналитической зоны ИЭ*	Интенсивность окрашивания**, измеренная анализатором «Рефлеком», усл.ед. (n=5)	
			Аналитическая зона ИЭ	Контрольная зона ИЭ
Отрицательный контроль	0 м.к./мл	-	1,10±0,04	7,30±0,20
Риккетсии Бернета	5·10 <sup>5</sup> м.к./мл	+	1,20±0,04	7,40±0,10
штамм «Желтогорлая мышь-Луга»	1·10 <sup>6</sup> м.к./мл	++	2,30±0,02	7,70±0,20
	5·10 <sup>6</sup> м.к./мл	+++	4,90±0,10	8,10±0,30
	1·10 <sup>7</sup> м.к./мл	+++	6,30±0,02	7,90±0,20
	1·10 <sup>8</sup> м.к./мл	-	1,20±0,10	7,50±0,20
Риккетсии Провачека	1·10 <sup>8</sup> м.к./мл	-	1,10±0,05	7,40±0,10
Антиген риккетсий Провачека	8 АЕ/мл	-	1,10±0,03	7,80±0,20
Антиген риккетсий Сибирика	8 АЕ/мл	-	1,20±0,04	8,0±0,10
Осповакцина, штамм Л-ИВП	1·10 <sup>8</sup> ООЕ/мл	-		

\* «-» – отсутствие видимой глазом полосы; «+» – слабая красно-вишневая полоса; «++» – четко различимая красно-вишневая полоса; «+++» – четкая, интенсивно окрашенная полоса.

\*\* А – среднее значение показаний прибора, усл.ед., ε – рассчитанная погрешность измерения при 95 % надежности и коэффициенте Стьюдента t<sub>p</sub>=2,78.

При изучении специфичности полученных ИЭ показано, что разработанный ИЭ специфичен, не дает перекрестных реакций с другими представителями семейства *Rickettsiaceae* – риккетсиями Провачека в концентрации 1·10<sup>8</sup> м.к./мл, антигенными комплексами риккетсий Провачека и риккетсий Сибирика в концентрации 8 АЕ/мл, и вирусом осповакцины штамма Л-ИВП в концентрации 1·10<sup>8</sup> ООЕ/мл (таблица).

Чувствительность ИЭ для выявления риккетсий Бернета укладывается в типичные диапазоны чувствительности иммунохроматографического метода при выявлении клеток микроорганизмов и токсинов, так например, бактерии выявляются в диапазоне 2·10<sup>5</sup> – 1·10<sup>6</sup> КОЕ/мл, вирусы 2·10<sup>5</sup> – 5·10<sup>7</sup> БОЕ/мл, а бактериальные токсины 50–250 мг/мл [9].

Время анализа с помощью ИЭ составляло 20 мин при комнатной температуре. Экспериментально доказано, что чувствительность и время анализа с помощью ИЭ в диапазоне температур 10–35 °С не изменялась. Нами показано, что при добавлении в суспензии риккетсий почвенной пыли до конечной концентрации 0,1 мг/мл чувствительность ИЭ не уменьшалась, а ложноположительные результаты анализа не возникали. Время хранения ИЭ в упаковке не менее 1 года при комнатной температуре.

В результате проведенных исследований разработаны иммунохроматографические ИЭ для выявления риккетсий Бернета с чувствительностью 1·10<sup>6</sup> м.к./мл. Короткое время анализа, отсутствие дополнительных технологических операций, визуальная и (или) приборная регистрация позволяют рассматривать иммунохроматографический метод выявления риккетсий Бернета как один из вариантов выявления этих микроорганизмов в полевых условиях при мониторинге объектов окружающей среды. ИЭ можно также использовать как дополнительное средство иммунохимического анализа, повышающее достоверность идентификации риккетсий, после этапа биологического обогащения проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосенкова Н.И., Дайтер А.Б., Токаревич Н.К. Лихорадка Ку. Лабораторные исследования в эпидемиологической практике. Л.; 1976. С. 67–85.

2. Лобан К.М. Лихорадка Ку (кокциеллез). М.: Медицина; 1987. 128 с.  
 3. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.  
 4. Титов А.А., Шиленко И.В., Морозов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов. *Прикладная биохим. и микробиол.* 2012; 48(2):249–56.  
 5. Ярков С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А., Злобин В.Н. Индикация возбудителей особо опасных заболеваний с помощью иммунохроматографии и видеодигитрового анализа. *Вестник РАМН.* 2007; 12:22–6.  
 6. Fiset P., Wisserman C.L., El Batawi Y. Immunologic evidence of human fetal infection with *C. burnetii*. *Am. J. Epidem.* 1975; 101(1):65–9.  
 7. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and antiimmunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and coat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.* 1977; 25 (11):1187–200.  
 8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press. Inc.; 1996. P. 593–604.  
 9. Peruski A.H., Peruski L.F. Immunological methods for detection and identification infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13

References

1. Amosenkova N.I., Dayter A.B., Tokarevich N.K. [*Coxiella burnetii* Infection. Laboratory Studies in Epidemiological Investigations]. L.; 1976 P. 67–85.  
 2. Loban K.M. [*Coxiella burnetii* Infection]. M.: Meditsina; 1987. 128 p.  
 3. Onishchenko G.G., editor [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents: Practice Guidelines]. M.: ЗАО “Gigiena”; 2006. 288 p.  
 4. Titov A.A., Shilenko I.V., Morozov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. [Development and optimization of immune-chromatographic assays for botulinum toxin detection]. *Priklad. Biokhim. Mikrobiol.* 2012; 48(2):249–56.  
 5. Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Basharova L.A., Zlobin V.N. [Indication of pathogenic agents causing particularly dangerous infections using immunochromatography and image digitizing]. *RAMS Bulletin.* 2007; 12:22–6.  
 6. Fiset P., Wisserman C.L., El Batawi Y. Immunologic evidence of human fetal infection with *C. burnetii*. *Am. J. Epidem.* 1975; 101(1):65–9.  
 7. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and antiimmunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and coat antihuman immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.* 1977; 25 (11):1187–200.  
 8. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press. Inc.; 1996. P. 593–604.  
 9. Peruski A.H., Peruski L.F. Immunological methods for detection and identification infectious disease and biological warfare agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13

Authors:

Basharova L.A., Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Zlobin V.N. State Research Institute for Biological Instrumentation Engineering at the Federal Medical-Biological Agency. Moscow, Russian Federation

Об авторах:

Башарова Л.А., Ярков С.П., Третьяков С.И., Злобин В.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, корпус 1. E-mail: niibp@dol.ru

Поступила 04.06.13.