

А.А.Зайцев, О.А.Гнусарева, Н.С.Царева, В.В.Остапович, И.Ю.Борздова, А.Н.Куличенко

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ВЫЯВЛЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *FRANCISELLA TULARENSIS* ПРИ МОНИТОРИНГЕ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Показано, что иммунохроматографические тест-системы можно использовать для экспресс-выявления липополисахарида туляремийного микроба при проведении идентификации штаммов *Francisella tularensis*, выделенных из природных очагов, а при эпизоотологическом обследовании – для исследования суспензий иксодовых клещей и внутренних органов, павших биопробных животных.

Ключевые слова: возбудитель туляремии, иммунохроматографическая тест-система, экспресс-выявление, идентификация, природные очаги туляремии.

A.A.Zaitsev, O.A.Gnusaeva, N.S.Tsareva, V.V.Ostapovich, I.Yu.Borzdova, A.N.Kulichenko

Immuno-Chromatographic Test System Application for Rapid Detection of *Francisella tularensis* Lipopolysaccharide in Monitoring of Natural Foci

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Immuno-chromatographic test systems are shown to be applicable for rapid detection of tularemia microbe lipopolysaccharide for identification of *Francisella tularensis* strains isolated in natural foci, and in epizootologic survey – for the analysis of suspensions of ixodic ticks and internal organs of dead animals.

Key words: tularemia agent, immuno-chromatographic test system, rapid detection, identification, natural foci of tularemia.

Имеются многочисленные сообщения о разработке иммунохроматографических тест-систем и использованию их для серологической диагностики различных инфекционных болезней, в том числе и туляремии [2, 5, 6, 7].

Принцип их действия заключается в том, что микробные клетки (липополисахарид) возбудителя туляремии, присутствующие в исследуемой пробе, взаимодействуют с мечеными золотом антителами и в последующем накапливаются в виде окрашенного комплекса антиген-антитело в тестовой зоне.

Цель работы – изучение возможности применения иммунохроматографических (ИХ) тест-систем, разработанных и изготовленных в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (п. Оболенск), для экспресс-выявления липополисахарида (ЛПС) туляремийного микроба при проведении мониторинга природных очагов Северного Кавказа.

Материалы и методы

Оценку диагностических свойств серологических тест-систем и диагностикумов проводили на штаммах *Francisella tularensis*: *F. tularensis subsp. holarctica* – 63 штамма из природных очагов Северного Кавказа и 1 – вакцинный, *F. tularensis subsp. tularensis* – 2 штамма, *F. tularensis subsp. mediasiatica* – 3 штамма. Штаммы выращивали на Ft-агаре в течение 48–72 ч при температуре 37 °С [4].

Для оценки специфичности использовали колониальные штаммы близкородственных микро-

организмов: 2 штамма *Brucella abortus* 19 ВА и 484, 2 штамма *B. melitensis* 16 М и 640, 1 штамм *B. suis* 1330, 2 штамма *Escherichia coli* O-111 и SA-18, 1 штамм *Salmonella typhimurium* 9640, 1 штамм *Yersinia enterocolitica* 383 и 1 штамм *Y. pestis* EV. Штаммы выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) или эритрит-агаре (рН 7,2) в течение 24–48 ч при температуре 37 °С.

Взвесь с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл по отраслевому стандарту мутности (ОСО 42-28-85П) готовили с использованием 0,01 М натрий-фосфатного буфера (НФБ) при рН 7,2–7,4 и обеззараживали в соответствии с п. 2.8.16 [1]. Затем путем последовательных десятикратных разведений получали взвеси концентрацией $1 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^6$ м.к./мл.

Для приготовления суспензий внутренних органов павших биопробных животных использовали НФБ (рН 7,2–7,4), после чего часть нативного материала обеззараживали в соответствии с п. 2.8.16 [1].

Суспензии *Dermacentor marginatus* и *D. reticulatus* готовили в НФБ (рН 7,2–7,4) из расчета 1,2–1,5 мл на один пул. Пробы обеззараживали добавлением проверенного на бактерицидное действие формалина до 2 % конечной концентрации при 56 °С в течение 30 мин с последующей экспозицией не менее 12 ч при комнатной температуре.

Для постановки иммунохроматографических реакций использовали экспериментально-производственные и коммерческие серии образцов иммунохроматографических тест-систем. Это, соответственно, – «ИХ тест *F. tularensis*», представляющий собой пластиковую диагностическую панель (футляр)

с лункой для добавления образца и окошком для считывания результатов, и «Тест-полоска *F. tularensis*», представляющая собой мембранную полоску белого цвета с отметкой, которая указывает направление и предельную глубину погружения теста. Обе диагностические тест-системы были разработаны в ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (п. Оболенск) и предназначены для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии *F. tularensis*. Специфической мишенью для данных тестов является ЛПС *F. tularensis*.

Для постановки иммуносуппензионных реакций (РНГА и РНАт) и твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) использовали диагностикумы и тест-системы производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Результаты и обсуждение

Лабораторные испытания иммунохроматографических тест-систем проводили в четыре этапа. На первом этапе при оценке специфической активности «ИХ тест *F. tularensis*» использовали чистые культуры туляремийного микроба $1 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^7$ и $1 \cdot 10^6$ м.к./мл. У всех 69 штаммов *F. tularensis* наблюдали формирование полосы в тестовой зоне «Т» и контрольной в зоне «С». Отмечено, что интенсивность окраски тестовой полосы «Т» варьировала от насыщенного красного цвета (+++), до розового (++) или слабо-розового (+). У взвесей концентрацией $1 \cdot 10^7$ м.к./мл обычно наблюдали слабо прокрашенные полосы (+), а у взвесей $1 \cdot 10^8$ и $1 \cdot 10^9$ м.к./мл выявляли преимущественно четкие полосы (++) и (+++). У взвесей концентраций $1 \cdot 10^6$ м.к./мл *F. tularensis* отсутствовало формирование полосы в тестовой зоне.

Все использованные в работе штаммы возбудителя туляремии трех подвидов дали положительные результаты реакций в иммунохроматографической тест-системе для экспресс-выявления и идентификации *F. tularensis*. Учет положительных результатов регистрировали в течение 15–20 мин, что соответствовало требованиям нормативной документации, но отмечено влияние на результат реакции концентрации взвеси микробных клеток туляремийного микроба. Стабильно четкие положительные результаты были получены при выборе концентрации $1 \cdot 10^8$ м.к./мл. Поэтому нами рекомендуется начинать исследование с этой концентрации взвеси. Только в случае получения сомнительного результата следует ставить иммунохроматографическую реакцию с взвесями концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл.

Для оценки специфичности использовали взвеси коллекционных штаммов близкородственных микроорганизмов концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Получены отрицательные результаты с взвесями: *B. abortus* – 2 штамма, *B. melitensis* – 2, *B. suis* – 1, *E. coli* – 2, *S. typhimurium* – 1, *Y. pestis* – 1, *Y. enterocolitica* – 1, что указывает на достаточно высокую специфичность

ИХ тест-системы – «ИХ тест *F. tularensis*».

На втором этапе проведен сравнительный анализ чувствительности ИХ тест-системы – «ИХ тест *F. tularensis*» с РНГА, РНАт и ТИФА на взвесах штаммов туляремийного микроба, выращенных на Ft-агаре. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, наиболее чувствительным методом является ТИФА. «ИХ тест *F. tularensis*» и РНГА уступают по чувствительности ТИФА, но имеют более высокую чувствительность, чем РНАт.

На третьем этапе испытаний иммунохроматографических тестов и полосок ретроспективно исследовано 36 пулов иксодовых клещей из природного очага туляремии степного типа на территории Ставропольского края. Положительные результаты получены в 9 случаях и только в тех пробах, где через биопробу или методом прямого посева был выделен возбудитель туляремии (табл. 2).

Положительные иммунохроматографические реакции зарегистрированы с суспензией иксодовых клещей из Грачевского района во время эпизоотологического обследования весной 2010 г., а также при ретроспективном анализе замороженных суспензий иксодовых клещей, оставшихся после эпизоотологического обследования Изобильненского и Красногвардейского районов в 2008 г. Положительные результаты в иммунохроматографических реакциях с «ИХ тест *F. tularensis*» и «Тест-полоской *F. tularensis*» соответствовали положительным результатам в РНГА и ТИФА. По данным РНГА, концентрация возбудителя туляремии в этих суспензиях колебалась от 10^7 до 10^8 м.к. и выше. Полученные нами данные подтверждают сделанное ранее заключение о том, что от личинки до упитанной половозрелой самки количество туляремийных бактерий может увеличиться в клеще в 1000–10000 раз и достигнуть 10 млрд м.к. [3].

Учитывая корреляцию положительных результатов «ИХ тестов *F. tularensis*» и «Тест-полосок *F. tularensis*» для экспресс-выявления и идентификации возбудителя туляремии с наличием живого возбудителя туляремии в пулах суспензий иксодовых клещей, можно рекомендовать их использовать для

Таблица 1

Сравнительный анализ чувствительности «ИХ тест *F. tularensis*» (ИХТ), РНГА, РНАт и ТИФА при исследовании взвесей штаммов *F. tularensis*

Наименование штамма	Результаты серологических реакций при различных концентрациях взвесей, м.к./мл		
	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$
<i>F. tularensis holarctica</i> 3254	РНАт, ИХТ, ТИФА, РНГА	ИХТ, ТИФА, РНГА	ТИФА
<i>F. tularensis holarctica</i> 310	РНАт, ИХТ, ТИФА, РНГА	ИХТ, ТИФА, РНГА	ТИФА
<i>F. tularensis holarctica</i> 13/1	РНАт, ИХТ, ТИФА, РНГА	ИХТ, ТИФА, РНГА	ТИФА
<i>F. tularensis holarctica</i> 7 (с-52)	РНАт, ИХТ, ТИФА, РНГА	ИХТ, ТИФА, РНГА	ТИФА

Результаты иммунохроматографических реакций с пулами иксодовых клещей, от которых выделены культуры возбудителя туляремии

Дата сбора эктопаразитов	Адрес	Вид эктопаразита	Состав пула	№ штамма <i>Francisella tularensis</i>	Дата выделения культуры и метод	ИХТ	ИХП
23.03.08	Изобильненский р-н, около ст. Новотроицкая	<i>D. reticulatus</i>	12♂	C-89	14.04.08 через биопробу	+	+
23.03.08	Изобильненский р-н, около г. Солнечнодольск	<i>D. reticulatus</i>	3♀	C-87	11.04.08 через биопробу	+	+
23.03.08	Изобильненский р-н, около г. Солнечнодольск	<i>D. reticulatus</i>	23♀	C-90	14.04.08 через биопробу	+	+
24.03.08	Красногвардейский р-н, при въезде в с. Покровское	<i>D. reticulatus</i>	17♀	C-91	14.04.08 через биопробу	+	+
24.03.08	Красногвардейский р-н, при въезде в с. Покровское	<i>D. reticulatus</i>	10♂	C-92	14.04.08 через биопробу	+	+
24.03.08	Красногвардейский р-н, при въезде в с. Покровское	<i>D. marginatus</i>	11♀	C-88	11.04.08 через биопробу	+	+
24.03.08	Красногвардейский р-н, около с. Покровское	<i>D. reticulatus</i>	9♂	C-93	14.04.08 через биопробу	+	+
24.03.08	Красногвардейский р-н, около с. Покровское	<i>D. reticulatus</i>	22♀	C-96	16.04.08 через биопробу	+	+
26.03.10	Грачевский р-н, около ст. Старомарьевка	<i>D. marginatus</i>	3♀	34	16.04.10 прямой посев	+	+

Примечание. ИХТ – реакция с «ИХ тестом *F. tularensis*»; ИХП – реакция с «Тест-полоской *F. tularensis*»; (+) – положительный результат реакции.

предварительного отбора проб, перспективных для последующего изучения бактериологическим и биологическим методами, а также подтверждения наличия туляремийного антигена в пулах.

На четвертом этапе были исследованы с использованием «ИХ тестов *F. tularensis*» и «Тест-полосок *F. tularensis*» суспензии внутренних органов белых мышей, павших после введения им подкожно по 0,2–0,5 мл суспензий пулов иксодовых клещей. Положительные результаты в 100 % случаев соответствовали пробам, в которых был обнаружен возбудитель туляремии.

Таким образом, учитывая методическую простоту постановки реакций с «ИХ тестом *F. tularensis*» и «Тест-полосками *F. tularensis*» для экспресс-выявления ЛПС – антигена возбудителя туляремии, возможность получения результата в течение 15–20 мин, можно рекомендовать их использовать для изучения проб, в которых возможно присутствие антигена в заведомо большой концентрации. К таким пробам относятся взвеси из штаммов возбудителя туляремии, выделяемых на территории природных очагов, суспензии внутренних органов павших биопробных животных и суспензии пулов иксодовых клещей. Пулы следует предварительно исследовать методом ТИФА, т.к. эта реакция имеет более высокую чувствительность.

Целесообразно использовать иммунохроматографические реакции для предварительного отбора проб, перспективных для последующего изучения бактериологическим и биологическим методами, а также подтверждения наличия туляремийного антигена в исследуемом материале. Вышеуказанные тест-системы обеспечивают воспроизводимость результатов анализа и их специфичность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): СП 1.3.1285-03. М.; 2003. 30с.
2. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.
3. *Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н.* Эпизоотология (природная очаговость) туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 136–206.
4. Эпидемиологический надзор за туляремией. МУ 3.1.2007-05. М.; 2005. 24 с.

Источники 5–7 см. в References.

References

1. [Safety of work with microorganisms of I-II pathogenicity groups]. Sanitary Rules.SR. 1.3.1285-03]. M.,2003; 30p.
2. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practical Guidelines]. M.; 2009. 472p.
3. *Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N.* [Epizootiology (natural focality) of Tularemia] in [Tularemia]. M., 1960. 459p.
4. [Epidemiological surveillance of tularemia]. MU 3.1.2007-05. M., 2005. 24p.
5. *Berdal B.P., Mehl R., Haaheim H., Loksa M., Grunow R., Burans J., Morgan C., Meyer H.* Field Detection of *Francisella tularensis*. Scand. J. Infect. Dis. 2000; 32:287–91.
6. *Brandonisio O., Fumarola L., Maggi P., Cavalliere R., Spinelli R., Pastore G.* Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral Leishmaniasis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2002; 21:461–4.
7. *Grunow R., Spletstoesser W., McDonald S., Otterbein C., O'Brien T., Morgan C., Aldrich J., Hofer E., Finke E.J., Meyer H.* Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PCR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7(1):86–90.

Authors:

Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Tsareva N.S., Ostapovich V.V., Borzdova I.Yu., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Царева Н.С., Остапович В.В., Борздова И.Ю., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 02.04.12.