

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-94-100

УДК 616.98:579.852.11

С.А. Курчева, М.М. Курноскина, И.В. Жарникова, А.Г. Кошкидько, Д.В. Русанова, А.Г. Рязанова, Л.Ю. Аксенова, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, А.Н. Куличенко

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПЕРОКСИДАЗНЫЙ КОНЪЮГАТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

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

Сибирская язва представляет собой актуальную проблему для ветеринарии и здравоохранения многих стран, включая Российскую Федерацию, что обуславливает необходимость совершенствования и разработки новых, чувствительных и специфичных диагностических средств. **Цель** работы – создание экспериментального пероксидазного конъюгата для выявления специфических антител к возбудителю сибирской язвы и оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа (ИФА). **Материалы и методы.** Для конструирования пероксидазного конъюгата использовали пероксидазу хрена и белок А *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, США). В качестве сенсибилизирующих агентов применяли бактериальные антигены, выделенные из штаммов *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Spо, *B. anthracis* Sterne 34 F2. Разработанные экспериментальные серии конъюгата исследовали в ИФА на способность связывать антитела сывороток крови больных сибирской язвой и вакцинированных лиц. Чувствительность, специфичность и точность метода рассчитывали с помощью встроенных функций пакета ROCR. **Результаты и обсуждение.** Разработан пероксидазный конъюгат для выявления специфических антител к возбудителю сибирской язвы при исследовании клинического материала, оптимизированы условия постановки ИФА. Для интерпретации результатов исследования использовали пороговое значение коэффициента позитивности, меньше которого результат считали отрицательным, а при равном или большем значении – положительным. В ходе испытания получены достоверные отличия в показателе «коэффициент позитивности» для групп «Здоровые»/«Больные» и «Здоровые»/«Вакцинированные», тогда как отличия между группами «Больные»/«Вакцинированные» были статистически незначимы. Максимальная точность метода наблюдалась при разведении сывороток крови 1:250 и 1:500. Установлена 100 % внутрисерийная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов. Чувствительность и специфичность экспериментальных пероксидазных конъюгатов составила соответственно 100 и 95,8 %, а точность – 97,6 %.

Ключевые слова: диагностика, сибирская язва, антитела, ИФА, пероксидазный конъюгат.

Корреспондирующий автор: Курчева Светлана Александровна, e-mail: kurcheva@yandex.ru.

Для цитирования: Курчева С.А., Курноскина М.М., Жарникова И.В., Кошкидько А.Г., Русанова Д.В., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Куличенко А.Н. Экспериментальный пероксидазный конъюгат для выявления специфических антител к возбудителю сибирской язвы в иммуноферментном анализе. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 2:94–100. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-94-100

Поступила 22.11.2021. Отправлена на доработку 03.03.2022. Принята к публ. 12.05.2022.

S.A. Kurcheva, M.M. Kurnoskina, I.V. Zharnikova, A.G. Koshkid'ko, D.V. Rusanova, A.G. Ryzanova, L.Yu. Aksenova, D.A. Kovalev, A.M. Zhiron, A.N. Kulichenko

Experimental Peroxidase Conjugate for Detection of Specific Antibodies to Anthrax Agent in Enzyme Immunoassay

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Anthrax poses a pressing issue for veterinary medicine and public health in many countries, including the Russian Federation, which necessitates the improvement and development of new, sensitive and specific diagnostic tools. **The aim** of the work was to create an experimental peroxidase conjugate for the detection of specific antibodies to the anthrax pathogen and to optimize the conditions for performing enzyme immunoassay (ELISA). **Materials and methods.** The peroxidase conjugate was constructed using horseradish peroxidase and *Staphylococcus aureus* protein A (Sigma-Aldrich, USA). Bacterial antigens isolated from strains of *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Spо, *B. anthracis* Sterne 34 F2 were used as sensitizing agents. The developed experimental batches of the conjugate were tested in ELISA for the ability to bind antibodies in the blood sera of anthrax patients and vaccinated individuals. The sensitivity, specificity, and accuracy of the method were calculated using the built-in functions of the ROCR software package. **Results and discussion.** The peroxidase conjugate to detect specific antibodies to the anthrax pathogen in the study of clinical material has been developed; conditions for the ELISA performance have been optimized. To interpret the results of the study, a threshold value of the positivity coefficient was used, below which the result was considered negative, and at an equal or higher value, positive. The test demonstrated significant differences in the “positivity coefficient” indicator for the “Healthy”/“Sick” and “Healthy”/“Vaccinated” groups, while the differences between the “Sick”/“Vaccinated” groups were statistically insignificant. The maximum accuracy of the method was observed at blood serum dilutions of 1:250 and 1:500. 100 % intra-run, run-to-run and series-to-series reproducibility has been established for all positive samples. The sensitivity and specificity of the experimental peroxidase conjugates were 100 and 95.8 %, respectively, and the accuracy was 97.6 %.

Key words: diagnostics, anthrax, antibodies, ELISA, peroxidase conjugate.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Svetlana A. Kurcheva, e-mail: kurcheva@yandex.ru.

Citation: Kurcheva S.A., Kurnoskina M.M., Zharnikova I.V., Koshkid'ko A.G., Rusanova D.V., Ryazanova A.G., Aksenova L.Yu., Kovalev D.A., Zhirov A.M., Kulichenko A.N. Experimental Peroxidase Conjugate for Detection of Specific Antibodies to Anthrax Agent in Enzyme Immunoassay. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; 2:94–100. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-94-100

Received 22.11.2021. *Revised* 03.03.2022. *Accepted* 12.05.2022.

Kurcheva S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3564-0791>
Kurnoskina M.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8265-5128>
Zharnikova I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-4089>
Koshkid'ko A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6617-9504>
Rusanova D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2229-6570>

Ryazanova A.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5196-784X>
Aksenova L.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7744-3112>
Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>
Zhirov A.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7698-7361>
Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

Сибирская язва – особо опасная зоонозная инфекционная болезнь, вызываемая грамположительным спорообразующим микроорганизмом – *Bacillus anthracis*. Сибирская язва потенциально заразна для большинства млекопитающих, однако в первую очередь поражает жвачных животных, поскольку они наиболее часто подвергаются воздействию патогена в окружающей среде [1]. Современный ареал сибирской язвы сельскохозяйственных и диких животных охватывает все континенты. Особенностью сибиреязвенного микроба является способность образовывать споры и сохранять жизнеспособность в почве многие десятилетия. Попадание спор *B. anthracis* в организм млекопитающих может привести к системной инфекции и летальному исходу. Споры считаются преобладающей формой *B. anthracis* вне хозяина, но при заражении споры прорастают, образуя вирулентные вегетативные формы, которые могут размножаться в больших количествах практически во всех тканях организма. Гибель хозяина и контакт инфицированных тканей с воздухом приводят к возвращению бактерии в спорную форму [2]. Значительное количество почвенных очагов на фоне неполного учета и охвата вакцинацией поголовья сельскохозяйственных животных обуславливает потенциальную угрозу осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве [3]. Люди обычно заражаются сибирской язвой при контакте с инфицированными животными и зараженными продуктами животного происхождения или при непосредственном контакте со спорами *B. anthracis* [4, 5]. Подтверждением этого стала крупнейшая эпизоотия сибирской язвы среди северных оленей в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г., повлекшая за собой эпидемические осложнения [6]. Современный уровень развития биотехнологии и генетики, чрезвычайно высокая поражающая способность и устойчивость к факторам внешней среды делают возбудитель сибирской язвы одним из наиболее привлекательных для террористов при использовании его в качестве биологического диверсионного агента. Поэтому изучение этой инфекции и ее возбудителя, а также проведение исследований в области совершенствования лабораторных методов диагностики и идентификации возбудителя сибирской язвы представляют собой одну из наиболее актуальных задач борьбы с сибиреязвенной инфекцией. Диагностика сибирской язвы у человека и животных основывается на эпизоотологических, эпидемиологических, клинических, лабораторных и патологоанатомических данных.

Лабораторные исследования направлены на обнаружение и идентификацию возбудителя сибирской язвы, выявление специфических антител и аллергической перестройки в организме больных людей. 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. На сегодняшний день производится только один препарат, предназначенный для обнаружения специфических антител к возбудителю сибирской язвы и допущенный к обращению на территории Российской Федерации – набор реагентов «Диагностикум эритроцитарный сибиреязвенный антигенный сухой» (ФСР 2012/13064) производства ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Все это делает актуальной разработку и производство набора для выявления специфических антител к возбудителю сибирской язвы в сыворотке крови людей непрямым методом иммуноферментного анализа (ИФА) [7–9].

Имуноферментный анализ чувствителен и позволяет проводить скрининг от сотен до тысяч образцов за короткий период времени, поэтому его использование является наиболее эффективным методом для выявления антител к *B. anthracis* в сыворотке, плазме или других биологических жидкостях. Токсин сибирской язвы состоит из трех белков, а именно: «защитного» протективного антигена (ПА), фактора отека и летального фактора. Поскольку ПА обладает иммуногенным действием, то есть способностью вызывать иммунный ответ организма [10, 11], для оценки вакцинации против сибирской язвы и ее диагностики [12] в ИФА используется полноразмерный ПА. В нескольких исследованиях оценивалась разработка и использование ИФА для обнаружения антител против ПА в популяциях домашнего скота [13, 14]. Однако при получении определенных успехов он все еще имеет ряд таких недостатков, как возможность возникновения ложноположительных

реакций, недостаточная надежность и отсутствие стандартизации анализа.

Клинический диагноз кожной формы сибирской язвы традиционно устанавливается микробиологическими методами, такими как выявление грамположительных капсулированных бацилл в мазке из пораженного участка или выделение *B. anthracis* в культуре. Однако окрашивание по Граму и посев на выявление *B. anthracis* могут быть неинформативными для пациентов, получавших антибиотикотерапию до сбора образцов. Иммуный ответ на ПА обнаруживается через 11 дней после появления симптомов и сохраняется более 8–16 месяцев. Таким образом, для эпиднадзора или во время вспышек, когда диагностические методы, чувствительные ко времени или лечению (например, посев, ПЦР и биопсия), могут быть неприменимы, серологическое тестирование может быть единственным подтверждающим диагностическим инструментом, который можно использовать [15].

Целью настоящей работы стало создание экспериментального пероксидазного конъюгата для выявления специфических антител к возбудителю сибирской язвы и оптимизация условий проведения иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

При работе по конструированию пероксидазного конъюгата (конъюгацию проводили по модифицированному методу M.V. Wilson, P.K. Nakane [16]) и оптимизации постановки ИФА использовали:

- пероксидазу хрена (ПХ) – индикаторный фермент (тип VI-A, R_z: ~3.0 с активностью 1550 units/mg; Sigma-Aldrich, США);

- белок А *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich, США). Белок А – белок с молекулярной массой 42 кДа, выделенный с поверхности клеточной стенки золотистого стафилококка. Белок А связывается с Fc-участком IgG млекопитающих.

В качестве сенсibiliзирующего агента апробированы:

- протективный антиген сибиреязвенного микроба, выделенный из культурального фильтрата рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔTPA-1S_{po} по методике, описанной Н.И. Микшис с соавт. [17] (представлен для исследований РосНИПЧИ «Микроб»). Качественный и количественный анализ, а также дополнительную очистку препаратов протективного антигена проводили в лаборатории биохимии Ставропольского противочумного института;

- водорастворимый сибиреязвенный антиген (ВА), извлеченный из бактериальной массы *B. anthracis* Sterne 34 F₂ (вегетативная форма), обеззараженной кипячением. Технология получения включала в себя водно-солевую экстракцию и ультразвуковую дезинтеграцию с последующим осаждением белковых фракций сульфатом аммония [18];

- комплекс вышеназванных антигенов в различном процентном соотношении компонентов.

Антигены хранили в лиофилизированном состоянии небольшими аликвотами (100 мкл; 3,0 мг/мл) в 0,9 % растворе натрия хлорида.

Результаты ИФА регистрировали с помощью фотометра Multiskan FC (Thermo scientific, Финляндия), измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. По результатам ОП рассчитывали значение критической оптической плотности (ОП_{крит.}) по формуле (1):

$$\text{ОП}_{\text{крит.}} = \text{ОП}_{\text{ср}} K^- + 0,1, \quad (1)$$

где ОП_{ср} K⁻ – среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Для интерпретации результатов исследования применяли коэффициент позитивности (КП), рассчитанный по формуле (2):

$$\text{КП} = \text{ОП}_{\text{иссл. сыв.}} / \text{ОП}_{\text{крит.}} \quad (2)$$

Для определения диагностической эффективности сконструированных экспериментальных серий конъюгата использовали сыворотки крови:

- здоровых взрослых людей, не болевших ранее сибирской язвой и не вакцинированных против нее, – 12 образцов. Сыворотки получены из ГБУЗ СК «Ставропольская краевая станция переливания крови»;

- больных кожной формой сибирской язвы – 5 образцов. Сыворотки получены из Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы;

- вакцинированных против сибирской язвы (взятие материала на 14-е сутки после вакцинации) – 4 образца. Сыворотки получены из Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы.

Все сыворотки были протестированы в двух экземплярах без тепловой инактивации с добавлением мертиолатата натрия до концентрации 1:10000.

В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку здорового человека, которую обрабатывали аналогичным образом.

В качестве твердой фазы применяли 96-луночные полистироловые планшеты с плоским дном фирмы Costar (США).

Обработку и статистический анализ данных проводили с использованием языка R (версия 4.0.2) [19], а также пакетов tidyverse [20], ROCR [21] и ggpubr [22]. Анализ групповых отличий проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа Краскела – Уоллиса. Отличия считали значимыми при p < 0,05. Чувствительность, специфичность и точность метода, а также площадь под ROC-кривой рассчитывали с помощью встроенных функций пакета ROCR.

Основные параметры ИФА, а именно чувствительность, точность и воспроизводимость, могут существенно изменяться при варьировании условий проведения эксперимента (температура, ионная сила и pH реакционной среды, концентрационные соотношения компонентов и продолжительность

их взаимодействия). Это определяет необходимость оптимизации каждой стадии анализа, для чего использовали эмпирический подбор параметров постановки теста.

Результаты и обсуждение

При создании диагностического теста важным моментом является определение его антигенной композиции и условий адсорбции на твердой фазе, т.е. установление оптимальной концентрации антигена (Аг), состава сенсibiliзирующего буфера, условий отмывания несвязавшихся компонентов, времени и температуры связывания Аг с поверхностью полистироловых планшетов. Оптимальную сенсibiliзирующую дозу бактериального агента определяли в серии опытов с использованием сывороток крови больных сибирской язвой, вакцинированных, а также здоровых людей и пероксидазного конъюгата с белком А. В экспериментах испытывали различные виды Аг в концентрациях 10, 50, 100, 200, 300 мкг/мл и их смеси в разных пропорциях. Процесс адсорбции Аг оценивали по интенсивности реакции с контрольными сыворотками крови людей. Наиболее оптимальный уровень насыщения поверхности лунок планшета достигался при их сенсibiliзации комплексом антигенов с содержанием в 1 мл 0,1 М раствора фосфатно-солевого буфера (ФСБ), рН 7,2: ПА – 30 мкг и ВА – 100 мкг.

Для определения оптимальных условий инкубации при сенсibiliзации комплексом (ВА+ПА) оценивали интенсивность реакции при выдерживании (3, 2, 1 ч) в термошейкере (37±1) °С (250 об/мин), а также 18 ч при температуре 4 °С. Анализ результатов проведенных исследований позволил установить, что оптимальным для сенсibiliзации лунок планшета (ВА+ПА) является режим 37 °С, 3 ч в условиях термошейкера, в то время как при остальных значениях выдержки адсорбционная способность анти-

генного комплекса, а также специфичность реакции несколько ниже. Инкубация при температуре 4 °С возможна при определенных условиях расчета времени постановки реакции без потери чувствительности и специфичности.

В ходе работ установлена необходимость блокирования свободных центров связывания для исключения «фоновых помех». При разведении клинических образцов сывороток крови людей и иммунопероксидазного конъюгата целесообразно использовать ФСБ с 0,5 % БСА и Tween 20 до 0,05 %.

Далее была оптимизирована стадия взаимодействия опытных сывороток крови с иммобилизованными на поверхности полистирола специфическими антигенами. Исследования проводили в интервале от 30 до 90 мин при температуре 37 °С и иммунопероксидазным конъюгатом (от 15 до 60 мин с шагом 15). Оптимальное время инкубации сывороток составило 60 мин, а инкубация планшета с иммунопероксидазным конъюгатом – 15 мин в условиях термошейкера (700 об/мин). В более короткий срок не происходит эффективного взаимодействия компонентов реакции, а увеличение продолжительности инкубации не только удлиняет время постановки реакции, но и способствует появлению фонового окрашивания.

При определении рабочего разведения пероксидазного конъюгата максимальные значения зафиксированы при его взаимодействии с испытуемыми сыворотками – 15 мин при температуре 37 °С с перемешиванием в термошейкере 700 об/мин с разведением конъюгата 1:2000.

При интерпретации результатов исследования использовали пороговое значение коэффициента позитивности, меньше которого результат считали отрицательным, а при равном или большем значении – положительным. В ходе оптимизации данного параметра отмечено, что с увеличением порогового значения КП уменьшается чувствительность и увеличивается специфичность метода (рис. 1).

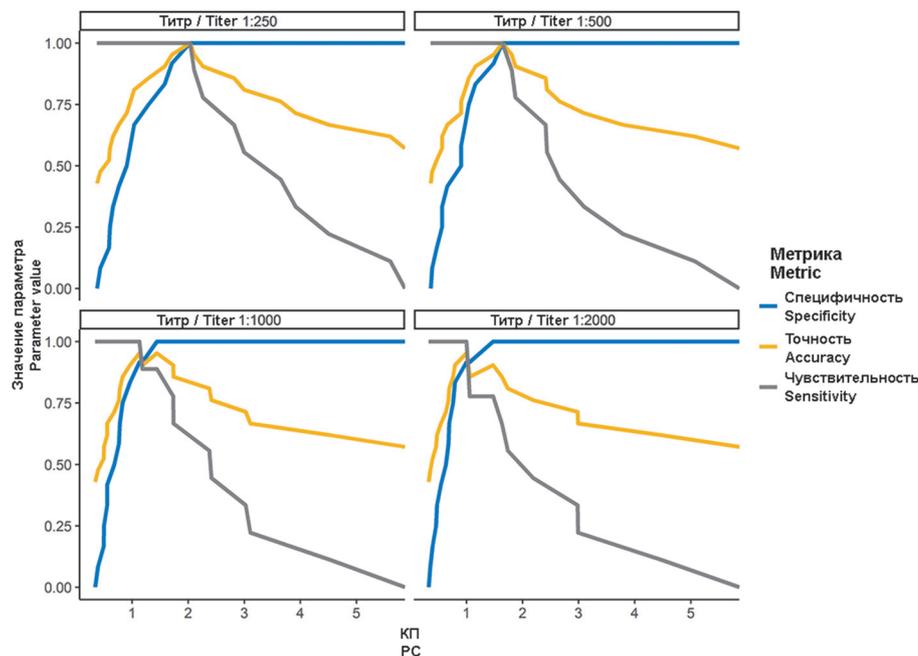


Рис. 1. Кривые чувствительности, специфичности и точности при постановке ИФА: КП – коэффициент позитивности

Fig. 1. Sensitivity, specificity and accuracy curves in ELISA: PC – positivity coefficient

Метрики пероксидазного конъюгата в ИФА
Metrics of peroxidase conjugate in ELISA

Титр Dilution titer	Пороговое значение КП Threshold value of PC	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %	Точность, % Accuracy, %
1:250	2,035	100	100	100
1:500	1,640	100	100	100
1:1000	1,132	100	91,67	91,67
1:2000	1,001	100	91,67	91,67

В качестве порогового значения КП использовали значение из точки пересечения кривых чувствительности и специфичности, где вероятности совершения ошибки I и II рода равны, а точность метода максимальна (таблица). Итоговые чувствительность и специфичность экспериментальных серий изготовленного пероксидазного конъюгата при постановке ИФА составили соответственно 100 и 95,8 %, а точность – 97,6 %.

Одной из важнейших метрик качества бинарного классификатора является ROC-кривая, показывающая зависимость доли истинноположительных результатов от доли ложноположительных результатов при варьировании порога решающего правила. Количественную интерпретацию ROC-кривой дает показатель AUC – площадь, ограниченная ROC-кривой и осью доли ложных положительных результатов. Для данного исследования пероксидазного конъюгата в ИФА $AUC=0,9815$, что соответствует высокому качеству модели с большой прогностической силой (рис. 2).

При испытании экспериментальных серий конъюгата использовали различные разведения (от 1:250 до 1:2000) сывороток крови больных и вакцинированных против сибирской язвы, которые вносили в лунки планшета, сенсibilизированные комплексным антигеном (ВА+ПА). Постановка реакции осуществлялась согласно отработанным параметрам. Результаты исследования представлены на рис. 3.

В ходе лабораторных испытаний установлено, что для всех титров получены достоверные отличия в показателе КП для групп «Здоровые»/«Больные» и «Здоровые»/«Вакцинированные», тогда как отличия между группами «Больные»/«Вакцинированные» статистически незначимы. При разведениях сыворотки 1:250 и 1:500 для всех проб получен правильный результат, тогда как при больших разведениях обнаружено по одному ложноположительному результату.

В результате проведенных исследований изготовлен пероксидазный конъюгат с белком *A. S. aureus* для использования в иммуноферментном анализе при выявлении специфических антител к возбудителю сибирской язвы в лабораторных условиях. Установлены оптимальные параметры и условия постановки ИФА с разработанным конъюгатом:

- сенсibilизация планшета раствором антигенного комплекса (ВА, 10 мкг + ПА, 3 мкг в лунку) в 0,1 М ФСБ, pH 7,2; время сенсibilизации лунок – 3 ч в условиях термощейкера (250 об/мин; 37 °С);
- буферный раствор для разведения образцов сывороток крови и пероксидазного конъюгата – ФСБ, pH 7,2, содержащий 0,05 % Tween 20 и 0,5 % БСА;
- взаимодействие сывороток с иммобилизованным антигенным комплексом – 60 мин в условиях термощейкера (700 об/мин; 37 °С), после инкубации – пятикратное промывание лунок планшета раствором фосфатно-солевого буфера с Tween 20 (ФСБ-Т, pH 7,3);

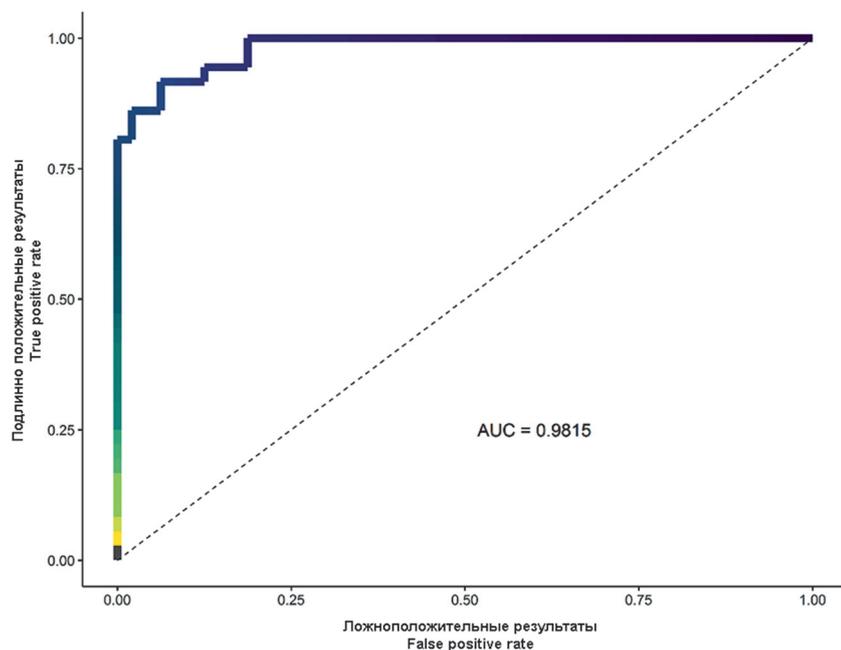


Рис. 2. ROC-кривая для исследования пероксидазного конъюгата в ИФА

Fig. 2. ROC-curve for the study of peroxidase conjugate in ELISA

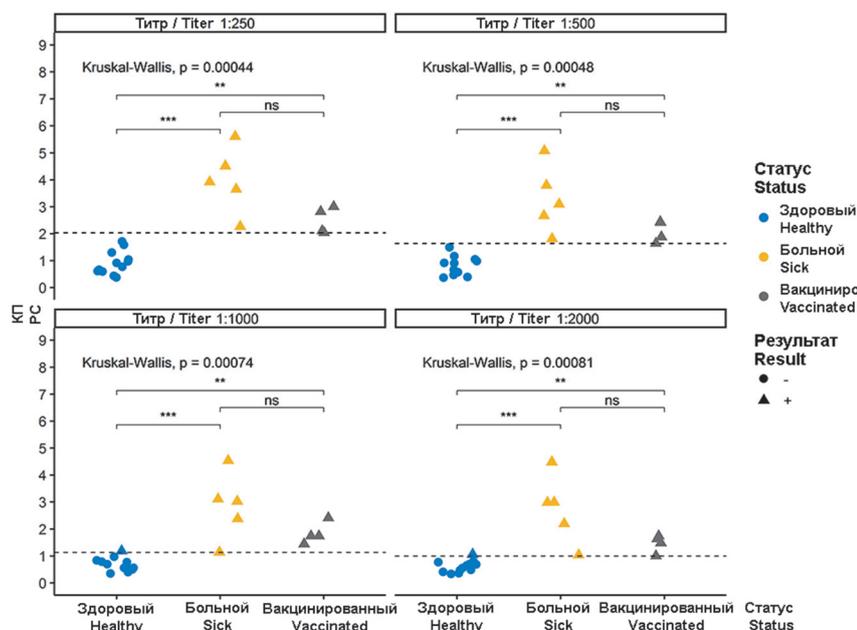


Рис. 3. Результаты ИФА. Уровни статистической значимости:

ns – p ≥ 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001; пунктирной линией указано пороговое значение КП

Fig. 3. ELISA results. Statistical significance levels:

ns – p ≥ 0.05; ** – p < 0.01; *** – p < 0.001; the dotted line indicates the threshold value of the PC

- время экспозиции с конъюгатом – 15 мин в условиях термощейкера (700 об/мин; 37 °С), после инкубации пятикратное промывание лунок планшета ФСБ-Т;

- после промывания проведение детекции ферментативной активности образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов: в лунки помещают по 100 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в субстратном буфере, содержащем перекись водорода, выдерживают планшет в течение 10 мин в защищенном от света месте. Реакцию останавливают добавлением в лунки по 100 мкл 4N раствора серной кислоты;

- результаты анализа регистрируют измерением ОП в лунках планшета на спектрофотометре при двухволновом режиме: при основной длине волны – 450 нм и длине волны сравнения – 620 нм.

Чувствительность, специфичность и точность экспериментальных серий изготовленного пероксидазного конъюгата при постановке ИФА составили соответственно 100; 95,8 и 97,6 %.

Разработанный пероксидазный конъюгат с протеином *A. S. aureus* достаточно прост в исполнении и может применяться для определения наличия антител в сыворотках крови больных сибирской язвой и вакцинированных лиц методом иммуноферментного анализа. Обладает высокой чувствительностью и стабильностью.

Положительные результаты исследуемых сывороток крови больных сибирской язвой и вакцинированных лиц подтверждены при использовании дополнительных методов исследования Референс-центром по мониторингу за возбудителем сибирской язвы с использованием экспериментальных тест-систем производства Ставропольского противочумного института (непрямой метод флуоресцирующих антител [7] и *in vitro* аллергодиагностика с сибирезынным аллергеном методом проточной цитометрии [23]).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.
2. Koehler T.M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):386–96. DOI: 10.1016/j.mam.2009.07.004.
3. Chateau A., Van der Verren S.E., Remaut H., Fioravanti A. The *Bacillus anthracis* cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance. *Microorganisms.* 2020; 8(12):1864. DOI: 10.3390/microorganisms8121864.
4. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(6):1218–24. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.05.013.
5. Doganay M., Demiraslan H. Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* 2015; 10(1):10–29. DOI: 10.2174/1574891x10666150408162354.
6. Попова А.Ю., Куличенко А.Н., редакторы. Опыт ликвидации вспышки сибирской язвы на Ямале в 2016 году. Ижевск: Принт-2; 2017. 313 с.
7. 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. Разработка и апробация тест-системы для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы непрямой метод флуоресцирующих антител. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 4:76–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-76-78.
8. Grundmann O. The current state of bioterrorist attack surveillance and preparedness in the US. *Risk Manag. Healthc. Policy.* 2014; 7:177–87. DOI: 10.2147/RMHP.S56047.
9. Сысуев Е.Б., Поздняков А.М., Стрыгин А.В., Ираклионов Н.С. Основные принципы диагностики бактериальных поражений. Сибирская язва. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2013; 7:95–6.
10. Marcus H., Danieli R., Epstein E., Velan B., Shafferman A., Reuveny S. Contribution of immunological memory to protective immunity conferred by a *Bacillus anthracis* protective antigen-based vaccine. *Infect. Immun.* 2004; 72(6):3471–7. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3471-3477.2004.
11. Reuveny S., White M.D., Adar Y.Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., Kobiler D., Shafferman A., Velan B. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69(5):2888–93. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.
12. Quinn C.P., Semenova V.A., Elie C.M., Romero-Steiner S., Greene C., Li H., Stamey K., Steward-Clark E., Schmidt D.S., Mothershed E., Pruckler J., Schwartz S., Benson R.F., Helsel L.O., Holder P.F., Johnson S.E., Kellum M., Messmer T., Thacker W.L., Besser L., Plikaytis B.D., Taylor T.H. Jr, Freeman A.E., Wallace K.J., Dull P., Sejvar J., Bruce E., Moreno R., Schuchat A., Lingappa J.R., Martin S.K., Walls J., Bronsdon M., Carlone G.M., Bajani-Ari M., Ashford D.A., Stephens D.S., Perkins B.A. Specific, sensitive, and

quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(10):1103–10. DOI: 10.3201/eid0810.020380.

13. Kingston J.J., Majumder S., Uppalapati S.R., Makam S.S., Urs R.M., Murali H.S., Batra H.V. Anthrax outbreak among cattle and its detection by extractable antigen 1 (EA1) based sandwich ELISA and immuno PCR. *Indian J. Microbiol.* 2015; 55:29–34. DOI: 10.1007/s12088-014-0494-4.

14. Hassan J., Rahman M.B., Chowdhury S.M.Z.H., Rabidas S.K., Parvej M.S., Nazir K.N.H.N.H. ELISA based anthrax antibody titer in cattle induced by locally prepared anthrax vaccine originated from Sterne F-24 strain in Bangladesh. *Microbes Health.* 2015; 4(1):36–8. DOI: 10.3329/mh.v4i1.23104.

15. Ghosh N., Goel A.K. Anti-protective antigen IgG enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of cutaneous anthrax in India. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(8):1238–42. DOI: 10.1128/CVI.00154-12.

16. Wilson M.B., Nakane P.K. Recent developments in the per-iodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., editors. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1978. P. 215–24.

17. Микшиш Н.И., Попова П.Ю., Семакова А.П., Кудрявцева О.М., Бугоркова С.А., Кравцов А.И. Изучение влияния антигенов, полученных из рекомбинантного штамма *Bacillus anthracis* 55ΔTPA-1Sp_o, на органы и ткани иммунизированных животных. *Биотехнология.* 2017; 33(5):45–60. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60.

18. Горобец Е.А., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Василенко Н.Ф. Совершенствование способа получения иммунных кроличьих сибиреязвенных капсульно-соматических сывороток. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2008; 1:42–4.

19. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.R-project.org>.

20. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., D'Agostino McGowan L., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019; 4(43):1686. DOI: 10.21105/joss.01686.

21. Sing T., Sander O., Beerenwinkel N., Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics.* 2005; 21(20):3940–1. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti623.

22. Alboukadel Kassambara (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. [R package version 0.4.0]. [Электронный ресурс]. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

23. Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Косточенко М.В., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г., Аksenova Л.Ю., Буравцева Н.П., Тюменцева И.С., Курчева С.А., Куличенко А.Н. Применение CAST-теста для оценки у людей специфической реактивности к возбудителю сибирской язвы. *Медицинская иммунология.* 2020; 22(5):1017–24. DOI: 10.15789/1563-0625-UCT-2058.

References

1. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

2. Koehler T.M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):386–96. DOI: 10.1016/j.mam.2009.07.004.

3. Chateau A., Van der Verrén S.E., Remaut H., Fioravanti A. The *Bacillus anthracis* cell envelope: composition, physiological role, and clinical relevance. *Microorganisms.* 2020; 8(12):1864. DOI: 10.3390/microorganisms8121864.

4. Pilo P., Frey J. *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(6):1218–24. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.05.013.

5. Doganay M., Demiraslan H. Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Pat. Anti-Infect. Drug Discov.* 2015; 10(1):10–29. DOI: 10.2174/1574891x10666150408162354.

6. Popova A.Yu., Kulichenko A.N., editors. [Experience in Eradication of Anthrax Outbreak in Yamal in 2016]. Izhevsk: "Print-2"; 2017. 313 p.

7. Aksenova L.Yu., Ryzanova 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.N. [Construction and approval of the test-system for the detection of antibodies to anthrax agent using indirect fluorescent immunoassay]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (4):76–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-76-78.

8. Grundmann O. The current state of bioterrorist attack surveillance and preparedness in the US. *Risk Manag. Healthc. Policy.* 2014; 7:177–87. DOI: 10.2147/RMHP.S56047.

9. Sysuev E.B., Pozdnyakov A.M., Strygin A.V., Iraklionova N.S. [Basic principles of diagnosis of bacterial lesions.

Anthrax.] *Mezhdunarodny Zhurnal Prikladnykh i Fundamental'nykh Issledovaniy [International Journal of Applied and Basic Research]*. 2013; (7):95–6.

10. Marcus H., Danieli R., Epstein E., Velan B., Shafferman A., Reuveny S. Contribution of immunological memory to protective immunity conferred by a *Bacillus anthracis* protective antigen-based vaccine. *Infect. Immun.* 2004; 72(6):3471–7. DOI: 10.1128/IAI.72.6.3471-3477.2004.

11. Reuveny S., White M.D., Adar Y.Y., Kafri Y., Altboum Z., Gozes Y., Kobiler D., Shafferman A., Velan B. Search for correlates of protective immunity conferred by anthrax vaccine. *Infect. Immun.* 2001; 69(5):2888–93. DOI: 10.1128/IAI.69.5.2888-2893.2001.

12. Quinn C.P., Semenova V.A., Elie C.M., Romero-Steiner S., Greene C., Li H., Stamey K., Steward-Clark E., Schmidt D.S., Mothershed E., Pruckler J., Schwartz S., Benson R.F., Helsel L.O., Holder P.F., Johnson S.E., Kellum M., Messmer T., Thacker W.L., Besser L., Plikaytis B.D., Taylor T.H. Jr, Freeman A.E., Wallace K.J., Dull P., Sejar J., Bruce E., Moreno R., Schuchat A., Lingappa J.R., Martin S.K., Walls J., Bronsdon M., Carbone G.M., Bajani-Ari M., Ashford D.A., Stephens D.S., Perkins B.A. Specific, sensitive, and quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antibodies to anthrax toxin protective antigen. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(10):1103–10. DOI: 10.3201/eid0810.020380.

13. Kingston J.J., Majumder S., Uppalapati S.R., Makam S.S., Urs R.M., Murali H.S., Batra H.V. Anthrax outbreak among cattle and its detection by extractable antigen 1 (EA1) based sandwich ELISA and immuno PCR. *Indian J. Microbiol.* 2015; 55:29–34. DOI: 10.1007/s12088-014-0494-4.

14. Hassan J., Rahman M.B., Chowdhury S.M.Z.H., Rabidas S.K., Parvej M.S., Nazir K.N.H.N.H. ELISA based anthrax antibody titer in cattle induced by locally prepared anthrax vaccine originated from Sterne F-24 strain in Bangladesh. *Microbes Health.* 2015; 4(1):36–8. DOI: 10.3329/mh.v4i1.23104.

15. Ghosh N., Goel A.K. Anti-protective antigen IgG enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of cutaneous anthrax in India. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19(8):1238–42. DOI: 10.1128/CVI.00154-12.

16. Wilson M.B., Nakane P.K. Recent developments in the per-iodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., editors. *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1978. P. 215–24.

17. Mikshish N.I., Popova P.Yu., Semakova A.P., Kudryavtseva O.M., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L. [Study of the effect of antigens obtained from the recombinant *Bacillus anthracis* 55ΔTPA-1Sp_o strain on the organs and tissues of immunized animals]. *Biotechnologiya [Biotechnology]*. 2017; 33(5):45–60. DOI: 10.21519/0234-2758-2017-33-5-45-60.

18. Gorobets E.A., Afanas'ev E.N., Tyumentseva I.S., Vasilenko N.F. [Improvement of the method for obtaining immune rabbit anthrax capsular-somatic sera]. *Meditsinsky Vestnik Severnogo Kavkaza [Medical Bulletin of the North Caucasus]*. 2008; (1):42–4.

19. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. Available from: <https://www.R-project.org>.

20. Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., D'Agostino McGowan L., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T.L., Miller E., Bache S.M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D.P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. Welcome to the tidyverse. *J. Open Source Softw.* 2019; 4(43):1686. DOI: 10.21105/joss.01686.

21. Sing T., Sander O., Beerenwinkel N., Lengauer T. ROCr: visualizing classifier performance in R. *Bioinformatics.* 2005; 21(20):3940–1. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti623.

22. Alboukadel Kassambara (2020). ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. [R package version 0.4.0]. [Internet]. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.

23. Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Logvinenko O.V., Ryzanova A.G., Aksenova L.Yu., Buravtseva N.P., Tyumentseva I.S., Kurcheva S.A., Kulichenko A.N. [The use of the CAST test to assess human specific reactivity to anthrax agent]. *Meditsinskaya Immunologiya [Medical Immunology]*. 2020; 22(5):1017–24. DOI: 10.15789/1563-0625-UCT-2058.

Authors:

Kurcheva S.A., Kurnoskina M.M., Zharnikova I.V., Koshkid'ko A.G., Rusanova D.V., Ryzanova A.G., Aksenova L.Yu., Kovalev D.A., Zhirov A.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Об авторах:

Курчева С.А., Курноскина М.М., Жарникова И.В., Кошкидько А.Г., Русанова Д.В., Рязанова А.Г., Аksenova Л.Ю., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.