

Б.Г. Андрюков², Н.Ф. Тимченко¹, М.Б. Раев³

Конструирование неферментной тест-системы для безинструментального определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода в формате иммуномембранных технологий и возможности ее применения в клинической практике

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН, Владивосток

²1477 военно-морской клинический госпиталь флота, Владивосток

³Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь

Резюме. Представлена сконструированная авторами неферментная тест-система для диагностики псевдотуберкулеза на основе конъюгированных частиц углерода. Процедурно-аналитические характеристики предложенной диагностической тест-системы (высокие чувствительность и специфичность, простота в использовании, наглядность в оценке результатов), а также отсутствие необходимости в приборной детекции результатов делает привлекательным ее использование для раннего выявления специфических антител к *Yersinia pseudotuberculosis*.

Ключевые слова: псевдотуберкулез, диагностика, бесприборное выявление антител к *Yersinia pseudotuberculosis*.

Введение. До 50-х годов XX столетия псевдотуберкулез был редким заболеванием. Эпидемический процесс при этой инфекции проявлялся в виде единичных, не связанных между собой случаев болезни, не имеющих характерного клинического выражения. Положение изменилось в середине XX столетия, когда на Дальнем Востоке России (Приморский край) начали возникать крупные вспышки неизвестного ранее заболевания. В настоящее время псевдотуберкулез постоянно регистрируется в различных странах, в том числе и в Российской Федерации. Чаще всего псевдотуберкулез вызывает возбудитель O1 серовара, однако, нередко случаи заболевания, вызванные O3 сероваром *Y. pseudotuberculosis*. В настоящее время в нашей стране для иммунодиагностики этого заболевания используется в основном РНГА с эритроцитарным типоспецифическим антигеном.

Имеющиеся в арсенале современных лабораторий бактериологические, серологические и иммунологические методы диагностики псевдотуберкулеза лишь дополняют друг друга, так как каждый из них имеет свои недостатки и преимущества [1, 6]. Поэтому в наши дни актуальным является поиск высокоспецифичных, высокочувствительных и экономичных тест-систем, которые могли бы приобретать лаборатории независимо от степени оснащенности, и в короткие сроки верифицировать заболевание.

В настоящее время накоплен значительный опыт использования принципиально новых технологий создания диагностических систем, основанных на прямом мечении специфичных по отношению к определяемому веществу (лиганду) аффинных соединений (анти-лигандов) оптически плотными наночастицами коллоидного углерода. Главным преимуществом этих систем является прямое визуальное определение лиганда, что послужило основанием включить их в группу безинструментальных методов [3, 4, 10].

Основным моментом этих разработок стала двухэтапная технологическая схема синтеза углеродных конъюгатов, предусматривающая ковалентное связывание аффинных соединений с частицами углерода. Важным результатом разработанной технологии явилось получение устойчивой гетерогенной системы, обладающей одновременно свойствами истинного раствора и суспензии. Наночастицы коллоидного углерода, обладающие реальной поверхностью и находящиеся в водной фазе, не оседали и не всплывали под действием обычной гравитации [4, 10].

Цель исследования. Конструирование неферментной тест-системы для безинструментального определения антител к *Y. pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода в формате иммуномембранных технологий для повышения эффективности диагностики псевдотуберкулезной инфекции.

Материалы и методы. Получение углеродных наночастиц диаметром 162 нм и их последующий одноэтапный синтез с диагностическими реагентами проводили по методике, описанной в работах М.Б. Раева и соавт. [3, 4, 11]. В качестве источника частиц углерода использовали аморфный углерод, который получали в виде сажи путем конденсирования из пламени горящего толуола на стеклянной поверхности. В процессе получения суспензии углеродных частиц к 2% раствору белка G в забуференный фосфатами (рН 7,4) физиологический раствор (ЗФР) добавляли аморфный углерод до конечной концентрации 5% в условиях вихревого перемешивания на магнитной мешалке. В качестве антигена использовали комплекс антигенных белков, полученный по методике Тимченко и соавт. [1, 6].

Время, необходимое для полной пептизации частиц при комнатной температуре, составляло 30–36 ч. Полученную суспензию озвучивали в ультразвуковом дезинтеграторе. Условия ультразвуковой обработки суспензии (частота и мощность, количество и продолжительность циклов озвучивания) подбирали таким образом, чтобы обрабатываемый материал при одновременном (возможном) охлаждении не разогревался до температуры свыше 40°C. Полученный в результате эффективной ультразвуковой дезинтеграции суспензид центрифугировали при 6000 г в течение 5 мин с целью удаления оставшихся относительно крупных частиц. В суспензию пептизированных белком G частиц углерода на роторном встряхивателе вносили равный объем 25% глутарового альдегида. Процесс конъюгирования проводили в течение 1 ч 40 мин при комнатной температуре и интенсивном перемешивании, после чего реагент центрифугировали при 6000 г и освобождали от избытка глутарового альдегида и несвязавшегося антигена гелем-фильтрацией на колонке с Сефарозой CL-6B. В качестве основы твердофазного реагента использовали мембраны из нитроцеллюлозы с диаметром пор 0,45 мкм («Bio-Rad», США).

В первом случае твердофазный реагент аналитической системы готовили следующим образом. На диски из нитроцеллюлозной мембраны диаметром 5 мм наносили антиген (комплекс белков *Y. pseudotuberculosis*) по 5 мкл в концентрации 0,005 мг/мл в ЗФР с азидом натрия (ЗФР-NaN₃). В качестве внутреннего отрицательного контроля сорбировали бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации 0,05 мг/мл. После подсушивания мембраны и инкубации (1 ч) в блокирующем растворе, в качестве которого использовали ЗФР, содержащий 0,05% твина-20 и 1% казеина (ЗФР-ТК), мембраны помещали в лунки планшета, заполненные сывороткой, содержащей антитела к *Y. pseudotuberculosis* с серийным разведением, кратным двум, начиная с разведения 1:500. В качестве внешнего отрицательного контроля аналогично подготовленные мембраны твердофазного реагента вносили в лунки с сывороткой здорового мужчины с серийным разведением пробы, кратным двум, начиная с разведения 1:500. Время инкубации составляло 30 мин, после чего мембраны промывали

ЗФРТ и осуществляли визуальную (безинструментальную) детекцию конъюгатом G белок-углерод в течение 15 мин.

Во втором случае на диски из нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 0,45 мкм и диаметром 5 мм наносили комплекс антигенных белков *Y. pseudotuberculosis* по 5 мкл в концентрации 0,001 мг/мл в ЗФР-NaN₃. В качестве внутреннего отрицательного контроля наносили фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР). После подсушивания и инкубации (1 ч) мембраны в блокирующем растворе ЗФР-ТК, их помещали в лунки планшета, заполненные различными сыворотками, содержащими антитела к антигенам возбудителя псевдотуберкулеза (O1 и O3 сероваров), эшерихиоза, сальмонеллеза, иерсиниоза (O3, O9 сероваров), с серийным разведением, кратным двум, начиная с разведения 1:500. Учитывая, что возбудители псевдотуберкулеза, иерсиниоза, эшерихиоза и сальмонеллеза относятся к одному семейству *Enterobacteriaceae*, но к разным родам, кроме псевдотуберкулеза и иерсиниоза, в эксперименте оценивали перекрестные реакции антигена *Y. pseudotuberculosis* с вышеуказанными сыворотками. В качестве внешнего отрицательного контроля аналогично подготовленные мембраны твердофазного реагента вносили в лунки с сывороткой донора в разведении 1:200 и ФСБР. Время инкубации составляло 30 мин, после чего мембраны промывали ЗФРТ и осуществляли детекцию конъюгатом G-белок-углерод в течение 15 мин. Результат оценивали визуально по черному окрашиванию зоны специфического связывания углеродного диагностикума.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что разработанный безинструментальный способ диагностики псевдотуберкулеза путем прямой визуализации образующегося в ходе специфического взаимодействия иммунного комплекса, состоящего из используемого антигена *Y. pseudotuberculosis* и соответствующих антител, позволяет определять не только антитела к возбудителю псевдотуберкулеза O1 сероварианта, но O3. Возбудитель этих серовариантов чаще всего вызывает болезнь у человека. Это значительно расширяет диагностический диапазон предлагаемого способа диагностики. Визуализация специфического комплекса осуществляется конъюгатом G-белок-углерод в течение 15 мин.

На рисунке 1 отражены результаты анализа чувствительности системы определения антител в стандартной псевдотуберкулёзной сыворотке O1 серотипа. Титр антител составил 1:16000–1:32000. Отсутствие ложноположительных результатов во внешних и внутренних отрицательных контролях свидетельствует о высокой специфичности созданной системы. Время диагностической операции – 2 ч.

Результаты анализа специфичности показывают (рис. 2), что при чувствительности системы определения антител в псевдотуберкулёзной сыворотке 1:32000–1:64000, с сыворотками, содержащими антитела к антигенам других представителей семейства

Разведение

Yersinia pseudotuberculosis

сывороток: 1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000 1:16000 1:32000 1:64000 1:128000 отриц. контр

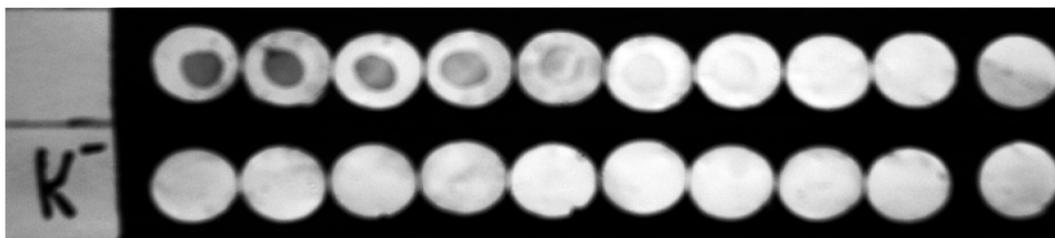


Рис. 1. Оценка чувствительности определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis*

Разведение

сывороток: 1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000 1:16000 1:32000 1:64000 1:128000 отриц. контр

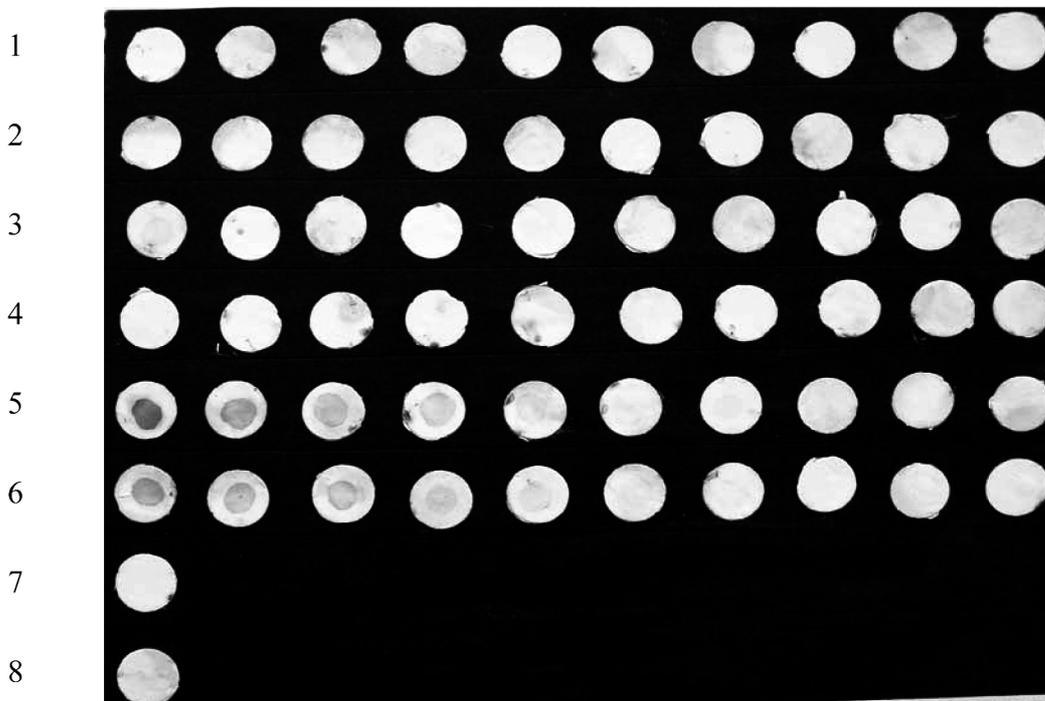


Рис. 2. Оценка специфичности определения антител к *Yersinia pseudotuberculosis*: 1 – сыворотка агглют. эшерихиозная; 2 – сыворотка сальмонеллезная адсорбир. для РА; 3 – сыворотка кишечно-иерсиниозная, О3 серовара, контрольная, титр антител 1:6400; 4 – сыворотка кишечно-иерсиниозная, контрольная, О9 серовара, титр антител 1:3200; 5 – сыворотка псевдотуберкулезная, контрольная, О1 серовара, титр антител 1:6400; 6 – сыворотка псевдотуберкулезная, контрольная, О3 серовара; 7 – сыворотка донора, титр антител 1:6400; 8 – фосфатно-солевой буферный раствор с твином

Enterobacteriaceae, в том числе, к *Y. enterocolitica*, положительных реакций не выявлено. Следовательно, сконструированный диагностикум является видоспецифическим.

Применяемые методики диагностики, основанные на использовании гемагглютинационных тестов обладают рядом существенных недостатков. Типовая специфичность (способность выявлять антитела только к возбудителю псевдотуберкулеза I сероварианта) ограничивает диагностическую ценность в тех случа-

ях, когда заболевание вызвано другими серовариантами *Y. pseudotuberculosis*. Необходимость наличия эритроцитов барана и их предварительной подготовки для сенсibilизации, нестабильность эритроцитарного диагностикума при хранении, невозможность сохранения (документирования) результатов анализа, а также длительность исследования (получение результатов через сутки) все это увеличивает диагностический период и отодвигает начало этиотропного лечения пациентов.

Выводы

1. Сконструирована и охарактеризована неферментная тест-система для безинструментального определения антител к видоспецифическому антигену *Y. pseudotuberculosis* на основе конъюгированных наночастиц углерода.

2. Показана возможность использования данной системы для диагностики псевдотуберкулеза и дифференциальной диагностики иерсиниозных инфекций.

3. Выявлены качественные процедурно-аналитические характеристики предлагаемой тест-системы: более высокая чувствительность, специфичность, оперативность, экономичность, надежность, а также отсутствие необходимости в приборном обеспечении исследований, что определяет привлекательность использования предлагаемой системы в клинической практике.

Работа выполнялась при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-96003 р_урал_a

Литература

1. Андрюков, Б.Г. Родо- и видоспецифические белки *Yersinia pseudotuberculosis*, их использование для конструирования диагностических препаратов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Б.Г. Андрюков. – Владивосток, 1999. – 24 с.

2. Девятилова, С.И. Эпидемиологическая ситуация по псевдотуберкулезу в Приморском крае / С.И. Девятилова, Г.А. Захарова, Т.Г. Нестерова // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2010. – № 1–2. – Т. 41–42. – С. 124–125.

3. Плаксин, Д. Метод стереоспецифического анализа и метод получения конъюгата для стереоспецифического анализа / Д. Плаксин, М. Раев, Е. Громаковская. – Патент РФ № 2089212 от 10.09.1997.

4. Раев, М.Б. Способ получения конъюгата для стереоспецифического анализа / М.Б. Раев. – Патент РФ № 2314827 от 20.01.2008.

5. Сомов, Г.П. Псевдотуберкулез / Г.П. Сомов [и др.]. – М.: Медицина, 2001. – 256 с.

6. Тимченко, Н.Ф. Способ получения термостабильного экзотоксина *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.Ф. Тимченко [и др.]. – А.с. № 1489185.1987

7. Тимченко, Н.Ф. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.Ф. Тимченко [и др.]. – Владивосток, 2004. – 220 с.

8. Asim, A.J. Pseudotuberculosis (*Yersinia*): Differential Diagnoses and Workup / A.J. Asim, C. Paul // Am. publ. health ass. – 2008. – Vol. 8. – P. 227–233.

9. Barnes, P.D. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine / Barnes P.D. [et al.] // J. exp. med. – 2006. – Vol. 203 (6). – P. 1591–1601.

10. Nowgessic, E. Outbreak of *Yersinia pseudotuberculosis* in British Columbia--November 1998 / E. Nowgessic [et al.] // Can. commun. dis. rep. – 1999. – Vol. 25 (11). – P. 97–100.

11. Rayev, M. Carbon-protein covalent conjugates in noninstrumental immunodiagnostic systems / M. Rayev, K. Shmagel. – Journal of immunological methods. – 2008. – Vol. 336, № 1. – P. 9–15.

B.G. Andryukov, N.F. Timchenko, M.B. Raev

Construction of non-enzymatic test kits for toolless detection of antibodies to *Yersinia pseudotuberculosis* on the basis of conjugated carbon nanoparticles in the form of immuno-membrane technology and its possible use in clinical practice

*Abstract. We have designed non-enzymatic test system for diagnosis of pseudotuberculosis on the basis of conjugated carbon particles. Procedural and analytical characteristics of the proposed diagnostic system (high sensitivity and specificity, ease of use, clarity in the evaluation of results), and no need for the instrument detection of results makes it attractive for the early detection of specific antibodies to *Yersinia pseudotuberculosis*.*

Key words: *pseudotuberculosis, diagnostics, non-instrumental revealing of antibodies to *Yersinia pseudotuberculosis*.*

Контактный телефон: (423) 253-94-43; e-mail: andrukov_bg@mail.ru