

того, РИД с использованием описанных МКА может быть применена в качестве дополнительного метода для выявления антигена 200 kDa возбудителя мелиоидоза в различных антигенных смесях.

Литература

1. Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М. и др. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхолдерий // Проблемы особо опасных инф. – 2012. – Вып. 113. – С. 82-85.
2. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под редакцией академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. Изд. 2-е, переработанное и дополненное. М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
3. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirsinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the in vitro growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* // Acta Tropica. – 2000. – V. 74. – P. 221-228.
4. Use of monoclonal antibody to increase sensitivity and specificity in quantitative immunodiffusion assay/ Glodel M., Montgomery R. R., Smith C.G. et al. // J. Immunol. Meth. – 1982. – Vol.48, N1. – P. 13-22.

Ответственный автор:

Замарина Татьяна Валерьевна – научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Тел. (395-2) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.61:616.982.27-07

КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА В РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

А.М. Куделина¹, И.В. Новицкая², Е.В. Прохватилова¹

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград,

²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Проведены исследования по разработке нового латексного препарата, способного идентифицировать *Burkholderia pseudomallei*. Подобрана концентрация блокирующего буфера. Оптимальная нагрузка мелиоидозных иммуноглобулинов на полистирольных частицах составила 4 мг/мл. Определены аналитические характеристики полученного диагностикума. **Ключевые слова:** реакция латекс-агглютинации, мелиоидоз, латексный диагностикум, сенситин, иммобилизация.

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTICUM FOR THE DETECTION OF MELIOIDOSIS AGENTS IN LATEX AGGLUTINATION REACTION

A. M. Kudelina¹, I.V. Novitskaya², E.V. Prokhvatilova¹

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd¹, Volgograd State Medical University, Volgograd²

Studies on the development of recent latex diagnosticum capable to identify *Burkholderia pseudomallei* were conducted. The concentration of blocking buffer was chosen. Optimal capacity of melioidosis immunoglobulins on polystyrene particles was 4 mg/ml. Analytical descriptions of the resulted diagnosticum were determined.

Key words: reaction of latex-agglutination, melioidosis, latex diagnosticum, sensitine, immobiliza-

tion.

В современной лабораторной диагностике особо опасных инфекций, в частности мелиоидоза, необходимы простые и доступные методы исследования, направленные на сокращение времени проведения анализа и увеличение достоверности полученных результатов при высоких аналитических и диагностических характеристиках препаратов. Одним из таких методов является реакция латекс-агглютинации (РЛА), находящая в последнее время все более широкое распространение в мировой практике [2, 3]. На данный момент на территории Российской Федерации не существует зарегистрированных латексных препаратов, способных выявлять возбудителей мелиоидоза *B. pseudomallei* на различных этапах лабораторного анализа.

Цель работы – получение латексного иммуноглобулинового мелиоидозного диагностикума для индикации и идентификации *B. pseudomallei*.

Материалы и методы

В качестве носителя использовали коммерческие полистирольные частицы диаметром 0,8 мкм фирмы *Sigma*. На микросферах иммобилизовали иммуноглобулины, выделенные каприловой кислотой из гипериммунной мелиоидозной козьей сыворотки.

Схема иммунизации животных-продуцентов (коз) включала несколько месячных циклов четырехкратных инъекций антигенной взвеси в возрастающих дозах ($1,25 \cdot 10^8$; $2,5 \cdot 10^8$; $5 \cdot 10^8$; $1 \cdot 10^9$ м.к./мл) подкожно в паравертебральную область в смеси с неполным адъювантом Фрейнда. На 7-10 день после последней инъекции осуществляли забор крови. В работе использовали сыворотку с титром в РИД 1:256.

Для определения оптимальной нагрузки мелиоидозных иммуноглобулинов на полистирольные микросферы использовали концентрации сенситина от 0,03 до 4 мг/мл. При этом к латексным носителям добавляли взвеси иммуноглобулинов, пробы тщательно перемешивали и оставляли на два часа при 37 °C в условиях термостата. После инкубации нагруженные частицы дважды отмывали от несвязавшегося сенситина блокирующим свободные поверхности микросфер буфером путем двукратного центрифугирования при 5000 об/мин в течение 10 мин. В качестве блокирующего буфера использовали раствор бычьего сывороточного альбумина фирмы *Sigma* (БСА) [4]. Испытывали две концентрации БСА (0,5 % и 1 %) для сравнения их влияния на характер иммобилизации сенситина на латексе. Сенсибилизированные полистирольные частицы уравнивали в блокирующем буфере и оставляли на ночь при +4 °C, затем с полученными пробами ставили РЛА в слайдовом варианте.

Постановку РЛА проводили на чистой обезжиренной стеклянной пластинке: к капле исследуемого материала (10 мкл) добавляли латексный диагностикум (в том же объеме) и тщательно перемешивали. В присутствии гомологичного иммунореактанта наблюдали агглютинацию в виде белых хлопьев и участков просветления. При отрицательном результате реакции суспензия оставалась гомогенно мутной [1]. Чувствительность, специфическую активность и специфичность препарата проверяли с восьмью штаммами возбудителей мелиоидоза: *B. pseudomallei* C-141, *B. pseudomallei* 56770, *B. pseudomallei* 56638, *B. pseudomallei* 135, *B. pseudomallei* 51274, *B. pseudomallei* 60631, *B. pseudomallei* 61563, *B. pseudomallei* 100 и пятью штаммами условно-патогенных близкородственных микроорганизмов: *B. pseudocaligenes* BKMB-1300, *B. cepacia* AB-1934, *Pseudomonas fragii* 4002, *P. aeruginosa* PAO-1, *P. ovalis* BKMB-899, выделенных из различных источников на территории Европы и Азии и хранящихся в Коллекционном центре ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Результаты и обсуждение

В ходе исследований было установлено, что чувствительность диагностикума увеличивается пропорционально количеству сенситина, поэтому для оптимальной нагрузки на латексные частицы применяли концентрацию иммуноглобулинов 4 мг/мл (табл. 1).

Использование БСА для приготовления блокирующего буфера оказалось оптимальным при его концентрации 0,5 мг/мл 0,15 М фосфатно-буферного раствора. Увеличение нагрузки нейтрального белка, по-видимому, препятствовало взаимодействию антиген-антитело и отрицательно сказывалось на результатах реакции.

При изучении аналитических характеристик препарата применяли уравновешенные в 0,5 % блокирующем буфере полистирольные микросферы с иммобилизованными на них мелиоидозными иммуноглобулинами в концентрации последних 4 мг/мл. В РЛА были использованы инаktivированные взвеси возбудителей мелиоидоза, а также псевдомонозов и буркхольдериезов III-IV группы патогенности. С целью определения специфической активности проведена РЛА с набором инаktivированных штаммов *B. pseudomallei* (*B. pseudomallei* C-141, *B. pseudomallei* 56770, *B. pseudomallei* 56638, *B. pseudomallei* 135, *B. pseudomallei* 51274, *B. pseudomallei* 60631, *B. pseudomallei* 61563, *B. pseudomallei* 100). Оказалось, что пять штаммов взаимодействовали с диагностикумом в концентрации

1,56·10⁶ м.к./мл и три штамма – в концентрации 3,12·10⁶ м.к./мл.

Таблица 1.

Чувствительность диагностикума в зависимости от различной нагрузки сенситивом для выявления возбудителей мелиоидоза в РЛА

№ п/п	Концентрация иммуноглобулинов (мг/мл)	Концентрация <i>B. pseudomallei</i> (м.к./мл)						
		5·10 ⁷	2,5·10 ⁷	1,25·10 ⁷	6,25·10 ⁶	3,12·10 ⁶	1,56·10 ⁶	7,8·10 ⁵
1	0,03	-	-	-	-	-	-	-
2	0,05	-	-	-	-	-	-	-
3	0,1	+/-	-	-	-	-	-	-
4	0,2	+	+	+/-	-	-	-	-
5	0,4	+	+	-	-	-	-	-
6	0,8	+	+	+	+	+/-	-	-
7	1	+	+	+	+	+	-	-
8	2	+	+	+	+	+	+	-
9	4	+	+	+	+	+	+	+/-

Примечание: (+) – положительный результат;
(+/-) – сомнительный результат;
(-) – отрицательный результат реакции.

Для определения специфичности были использованы наборы инактивированных взвесей *B. pseudoalcaligenes* (BKMB-1300), *B. ceracia* (AB-1934), *P. fragii* (4002), *P. aeruginosa* (PAO-1), *P. ovalis* (BKMB-899). Положительные реакции с возбудителями мелиоидоза отмечались в концентрации последних от 3,12·10⁶ м.к./мл, при этом возбудители условно-патогенных буркхолдеризов и псевдомонозов не взаимодействовали с мелиоидозным латексным диагностикумом в концентрациях от 10⁸ м.к./мл.

Заключение

Таким образом, нами получена экспериментальная серия латексного иммуноглобулинового мелиоидозного диагностикума, способного специфически выявлять различные штаммы *B. pseudomallei* в концентрациях от 3,12·10⁶ м.к./мл и выше.

Литература

1. Бровкина А.Н. Разработка метода и тест-системы выявления бактерий рода *Salmonella* на основе латекс-агглютинации // Научный журнал КубГАУ – 2011. – № 72 (08). – С. 51
2. Шубин Г.Г., Ларионова Л.В., Карбышев Г.Л. и др. Конструирование и испытания листериозного антигенного полимерного диагностикума // Биотехнология. – 2009. – № 3. – С. 91-95.
3. Duval B.D., Elrod M.G., Gee J.E. et al. Evaluation of a Latex Agglutination Assay for the Identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* // The American journal of tropical medicine and hygiene – 2014. – 14 (0025). – С. 48
4. Garcia V.S., Gonzalez V.D., Marcipar I.S. et al. Optimisation and standardisation of an immunoagglutination assay for the diagnosis of Trypanosomacruzi infection based on latex-(recombinant antigen) complexes // Tropical medicine and international Health. – 2014. – 19(1) – P. 37-46.

Ответственный автор

Куделина А.М. научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru