



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 579.842.23.08

Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы

ТЮМЕНЦЕВА И.С., профессор (labdiagn@yandex.ru)
КУРЧЕВА С.А., кандидат биологических наук
АФАНАСЬЕВ Е.Н., профессор
ЖАРНИКОВА И.В., доктор биологических наук
ЖДАНОВА Е.В., кандидат биологических наук
СТАРЦЕВА О.Л., кандидат биологических наук
ГАРКУША Ю.Ю.
СЕМИРЧЕВА А.А.

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь

Представлен способ пробоподготовки образцов окружающей среды с использованием чумного иммуномагнитного сорбента, позволяющий обнаруживать типичные и измененные в антигенном отношении штаммы чумного микроба. Оценка эффективности сорбента проведена в лабораторных и полевых условиях, получены положительные результаты при исследовании искусственно и естественно загрязненных проб. Использование чумного иммуномагнитного сорбента обеспечивает избирательное концентрирование материала с низким содержанием патогена и очистку проб от возможной контаминации посторонней микрофлорой. Предложенный способ применим при осуществлении обследования на наличие возбудителя чумы разнообразных потенциально инфицированных объектов биотической (животные и эктопаразиты, вовлеченные в чумной цикл) и абиотической природы в конкретных очагах.

К л ю ч е в ы е с л о в а: чума, пробоподготовка, иммуномагнитный сорбент.

Tyumentseva I.S., Kurcheva S.A., Afanasev E.N., Zharnikova I.V., Zhdanova E.V., Startseva O.L., Garkusha Yu.Yu., Semircheva A.A. — Features of sample preparation with the use of immunomagnetic sorbent when studying field material for plague agent. Method for sample preparation of environmental samples using a plague immune-magnetic sorbent is presented, which makes it possible to detect typical and antigenically modified strains of a plague microbe. The efficiency of the sorbent was evaluated in laboratory and field conditions, positive results were obtained in the study of artificially and naturally contaminated samples. The use of plague immunomagnetic sorbent provides selective concentration of material with a low content of pathogen and purification of samples from possible contamination by extraneous microflora. The proposed method is applicable in conducting a survey for the presence of a plague agent of a variety of potentially infected biotic objects (animals and ctenocephalides involved in the plague cycle) and abiotic nature in specific foci.

К е у w o r d s: plague, sample preparation, immunomagnetic sorbent.

Проблематика борьбы с инфекционными болезнями сохраняет актуальность в связи с растущими региональными и глобальными интеграционными процессами, либерализацией торговли, ростом трансграничного перемещения людей. В ряде стран обострилась эпидемиологическая ситуация по чуме, появляются новые патогены, а известные инфекции в силу ряда факторов распростра-

няются на новые территории и меняют свои эпидемиологические свойства. В условиях взаимосвязанного и взаимозависимого мира все это продолжает угрожать здоровью населения, создавая риски санитарно-эпидемиологическому благополучию и биологической безопасности регионов. Сегодня любая вспышка инфекционного заболевания способна в считанные дни перерасти в глобальную угрозу [2].



Мониторинг инфекционных болезней является одной из наиболее важных составляющих комплекса мер по предотвращению и борьбе с эпидемиями. Для успешного решения этой задачи необходимо постоянно поддерживать высокий уровень иммунобиологических технологий [4, 6], среди которых особая роль принадлежит экспрессным методам диагностики, адаптированным для прямого исследования разнообразных потенциально инфицированных объектов биотической и абиотической природы. В связи с необходимостью методического совершенствования подготовки проб объектов окружающей среды для эффективной детекции возбудителей особо опасных инфекций актуальным направлением научных исследований является разработка способов применения магнитных сорбентов, обеспечивающих избирательное концентрирование и очистку проб от возможной контаминации посторонней микрофлорой [9].

Несмотря на меры общественного здравоохранения, направленные на искоренение чумы, заболевание сохраняется в некоторых странах и даже возрождается [10]. Многие годы свойство штаммов возбудителя чумы продуцировать капсульный антиген F1 относили к основным детерминантам его вирулентности. Его выявление служило подтверждением принадлежности исследуемых бактерий к виду *Y. pestis*. Однако в некоторых эндемичных очагах удалось обнаружить штаммы с нарушенной продукцией капсульного антигена, которые вызывают у чувствительных к ним организмов не острое заболевание чумой, а ее «подострую» форму, которая характеризуется затяжным инфекционным процессом, инкубационным периодом или даже вялым скрытым течением. Штаммы, которые синтезируют, но не секретируют капсульный антиген, были выделены от больных людей. С одной стороны, это подтверждает их опасность, а с другой — затрудняет детекцию и идентификацию, поскольку основные усилия и приемы диагностики направлены в основном на выявление капсульного антигена [1, 3].

Возбудитель чумы по своим биологическим свойствам отнесен к высшей

категории «А» среди наиболее опасных патогенных микроорганизмов — потенциальных агентов биологического оружия. Существует также угроза биотеррористических актов, приводящих к преднамеренному распространению *Y. pestis* в окружающей среде [5, 11]. Поэтому остается актуальным расширение арсенала препаратов для экспрессных методов детекции типичных и измененных в антигенном отношении штаммов чумного микроба.

Цель исследования

Разработка технологии пробоподготовки при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы с использованием иммуномагнитного сорбента для выявления типичных и дефектных по синтезу антигена F1 штаммов *Y. pestis*.

Материал и методы

При выполнении работы использованы 27 штаммов микроорганизмов I–IV групп патогенности разных родов и видов.

Для получения поливалентной чумной гипериммунной сыворотки использовали разработанную авторами статьи схему иммунизации с тималином и циклофосфаном. Схема основана на подборе оптимальной антигенной композиции: капсульный антиген F1, белково-липосахаридный комплекс (БЛП) и водно-солевой экстракт, в котором, по мнению ряда исследователей, обнаруживаются в тех или иных количествах все выявленные у чумного микроба антигены [7, 9].

Конъюгацию полученных иммуноглобулинов G (IgG) с индикаторным ферментом — пероксидазой хрена (тип VI-A, Rz: ~3.0 с активностью 1550 units/mg (Sigma) проводили по методу периодатного окисления.

Для подтверждения воспроизводимости и достоверности полученных при исследовании результатов проводили математическую обработку результатов экспериментов в программе EXCEL, производя расчет значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения, выборочной дисперсии, вероятного квадратичного отклонения при двух степенях свободы с доверительной вероятностью 0,95.



К настоящему времени разработан стандартный образец магносорбента (СО 007-9388-2015), на его основе был сконструирован иммуноглобулиновый чумной *магноиммуносорбент* (МИС) [8].

Для оценки специфической активности и специфичности было изготовлено семь экспериментальных серий МИС.

Результаты и обсуждение

Оценка чувствительности полученных МИС в лабораторных условиях была проведена на чистых культурах возбудителя чумы, типичных и дефектных по синтезу F1. Изучение специфичности МИС проведено на штаммах гетерологичных микроорганизмов: *Y. enterocolitica* (4 штамма), *Y. pseudotuberculosis* (6 штаммов), *Escherichia (E.) coli* (3 штамма), *Salmonella (S.) typhimurium* (2 штамма). Результаты исследований представлены в таблице.

При проведении *иммуноферментного анализа* (ИФА) с предварительной пробоподготовкой на МИС удалось обнаружить фракционные и дефектные по синтезу F1 штаммы чумного микроба в концентрации, равной разведению 10^{-7} – 10^{-6} ($1,0 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^3$ м.к./мл). Все изготовленные серии МИС не выявляли в ИФА гетерологичные штаммы в концентрации, равной разведению 10^{-4} ($1,0 \times 10^5$ м.к./мл) и выше.

Возможность детекции чумного микроба и его антигенов в объектах окружающей среды при помощи разработанного МИС осуществляли путем изучения искусственно контаминированных проб (почва, погадки хищных птиц) и полевого материала (блохи грызунов).

Исследования свидетельствовали, что в искусственно инфицированных пробах почвы и погадок удавалось обнаружить типичные и дефектные по синтезу антигена F1 штаммы *Y. pestis* в концентрации, равной разведению, не менее 10^{-6} ($1,0 \times 10^3$ м.к./мл), при этом гетерологичные микроорганизмы не были выявлены.

Исследования в полевых условиях проводили в Центрально-Кавказском природном очаге чумы на базе Эльбрусского отряда Кабардино-Балкарской противочумной станции Роспотребнадзора.

Детекцию чумного микроба проводили при исследовании блох *Citellophilus tesquorum*, собранных с каждого грызуна или из одной норы. Объединенные в пулы, от нескольких особей до 20 блох, заливали 3% формалином так, чтобы его избыток составлял примерно 2 мл, и растирали пестиком в фарфоровой ступке. После отстаивания не менее 3 ч отбирали надосадочную жидкость и проводили селективное концентрирование на МИС. В каждую пробу вносили 50 мкл 10% взвеси МИС и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30–40 мин. Далее жидкость из емкостей с исследуемыми пробами удаляли, придерживая МИС постоянным магнитом, далее с помощью дозатора полуавтоматического переносили МИС в пробирки типа *Eppendorf*, промывали шесть раз фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением неионного детергента Твин 20 и проводили ИФА.

Антиген возбудителя чумы был обнаружен в трех пробах. В этих же образцах получен положительный результат при исследовании эктопаразитами молекулярно-генетическим методом, используя набор реагентов для выявления ДНК *Y. pestis* в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс *Yersinia pestis*-FL».

Для исключения ложноположительных результатов при исследовании эктопаразитов были проведены экспериментальные исследования в реакции МИС + ИФА имаго пивших блох *Citellophilus tesquorum* и *Xenopsylla cheopis*, полученных из инсектария лаборатории медицинской паразитологии Ставропольского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Положительно реагирующих проб блох выявлено не было.

Для удобства использования в полевых условиях был сконструирован экспериментальный набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной для выявления типичных и дефектных по синтезу F1 штаммов *Y. pestis*, который рассчитан на проведение качественного экспресс-анализа в дубликатах 36 неизвестных и двух контрольных образцов, всего 76 определений, для выдачи предварительного ответа.



Заключение

Предложенный способ пробоподготовки, осуществляемой путем избирательного концентрирования на МИС,

имеет преимущество, позволяющее быстро и легко обнаруживать *Y. pestis* в образцах окружающей среды и эктопаразитах грызунов (блохах), одновре-

Результаты изучения чувствительности и специфичности чумного МИС в ИФА (выборочно)

№ п/п	Наименование штамма / наличие F1	Применение	
Производственные штаммы			
1	<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ (вакцинный) / F1+	выделение капсульного Аг, БЛП	
2	<i>Y. pestis</i> EV 5/ F1-	выделение водорастворимого Аг	
Контрольные штаммы			
		контроль специфической активности *	
		Серия 2	Серия 5
3	<i>Y. pestis</i> Java/ F1-	1,0×10 ³	1,0×10 ²
4	<i>Y. pestis</i> 796/ F1-	1,0×10 ³	1,0×10 ³
5	<i>Y. pestis</i> Harbin/ F1-	1,0×10 ³	1,0×10 ³
6	<i>Y. pestis</i> 461 / F1+	1,0×10 ²	1,0×10 ²
7	<i>Y. pestis</i> C-726 (169 КБ) / F1+	1,0×10 ²	1,0×10 ²
8	<i>Y. pestis</i> C-563 (356 А ₃) / F1+	1,0×10 ²	1,0×10 ²
9	<i>Y. pestis</i> 798/ F1+	1,0×10 ³	1,0×10 ³
10	<i>Y. pestis</i> A-1024/ F1+	1,0×10 ³	1,0×10 ²
11	<i>Y. pestis</i> 378-Аз/ F1+	1,0×10 ²	1,0×10 ²
12	<i>Y. pestis</i> C-529/ F1+	1,0×10 ³	1,0×10 ²
		контроль специфичности	
13	<i>Y. enterocolitica</i> 383	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
14	<i>Y. enterocolitica</i> 178	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
15	<i>Y. enterocolitica</i> 134	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
16	<i>Y. enterocolitica</i> 64	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
17	<i>E. coli</i> 113-3	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
18	<i>E. coli</i> Мк4	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
19	<i>E. coli</i> Тк7	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
20	<i>S. typhimurium</i> 9640	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
21	<i>S. typhimurium</i> 7407	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵
22–27	<i>Y. pseudotuberculosis</i> I–VI серовары	>1,0×10 ⁵	>1,0×10 ⁵

* Мутность микробной взвеси определяют в сравнении со стандартным образцом мутности (ОСО 42-28-85П), который откалиброван по международному стандартному образцу.



менное выявление типичных и дефектных по синтезу F1 штаммов чумного микроба в ИФА. Это может иметь большое значение при эпидемиологическом обследовании очагов чумы, т. к. дает

возможность обнаружения естественных или генетически модифицированных штаммов *Y. pestis* с отрицательным и/или положительным выражением F1 в образцах окружающей среды.

Литература

1. Арсеньева Т.Е., Трухачев А.Л., Васильева Е.А. и др. Особенности штаммов возбудителя чумы, не продуцирующих основного капсульного антигена F1, и апробация отдельных методов их детекции // *Universum: химия и биология*. — 2014. — № 8 (8). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1513> (дата обращения: 28.03.2018).
2. Итоговое заявление Пятого совещания глав служб государств-членов ШОС, отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. — Сочи. — 31 октября 2017 года // URL: http://rospotrebнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=9141 (дата обращения: 28.03.2018).
3. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба // *Инфекция и иммунитет*. — 2015. — Т. 5, № 3. — С. 201–218.
4. Кибирев Я.А., Исупов С.Г., Чухланцев Д.А. Современные молекулярно-генетические методы идентификации возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы // *Воен.- мед. журн.* — 2014. — Т. 335, № 10. — С. 50–54.
5. Манченко К.А., Кобзарь П.Е., Савченко О.А. и др. Обеспечение национальной безопасности при биотерроризме // *Вести МАНЭБ в Омской области*. — 2015. — № 1 (6). — С. 23–27.
6. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б. и др. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 3. Научное обеспечение националь-

- ного нормирования широкого формата биологической безопасности // *Вестник Рос. акад. мед. наук*. 2014. — Т. 69, № 11–12. — С. 118–127.
7. Семирчева А.А., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В. Получение биологического сырья для производства чумных бивалентных иммунобиологических препаратов / Общие угрозы — совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней: Материалы международной конференции. — Ставрополь, 2015. — С. 347–350.
8. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Старцева О.Л. и др. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний // *Технологии живых систем*. — 2017. — Т. 14, № 2. — С. 52–57.
9. Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Афанасьев Е.Н. и др. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. — 2015. — № 4 (56). — С. 21–25.
10. Simon S., Demeure C., Lamourette P. et al. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field investigation of Plague Foci // *PLoS One*. — 2013. — 8(1):e54947. doi: 10.1371/journal.pone.0054947. Epub 2013 Jan 29.
11. Yang R. Plague: Recognition, Treatment and Prevention // *Journal of Clinical Microbiology*. 2017 Oct 25. pii: JCM.01519-17. doi: 10.1128/JCM.01519-17.

ЛЕНТА НОВОСТЕЙ

В Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова состоялась лекция директора Департамента социальных гарантий Минобороны России.

Мероприятие, на котором присутствовал профессорско-преподавательский состав, слушатели и курсанты ВМА им. С.М.Кирова, было посвящено вопросам, связанным с денежным довольствием военнослужащих и заработной платой гражданского персонала Министерства обороны Российской Федерации, выплатами и положенными компенсациями. Начальник ВМА им. С.М.Кирова генерал-майор медицинской службы Александр Фисун, приветствуя гостей, отметил, что впервые за долгое время зарплата сотрудников академии серьезно выросла, в чем он видит существенную роль Департамента социальных гарантий МО. Юлия Яркова со своей стороны поблагодарила начальника финансово-экономической службы — главного бухгалтера ВМА им. С.М.Кирова Нину Азарову, оценив работу ее подразделения на «отлично». Лектор подчеркнула, что в настоящее время вопросам финансирования военнослужащих и служащих МО РФ государством уделяется большое внимание. Все социальные гарантии во исполнение указов президента и приказов министра обороны исполняются в полном объеме.

Департамент информации и массовых коммуникаций
Министерства обороны Российской Федерации, 1 апреля 2018 г.
https://function.mil.ru/news_page/country/more.htm?id=12169397@egNews