

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ КОКСИЕЛЛ БЕРНЕТА, ВЫДЕЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

***В. П. Смелянский, С. Т. Савченко, Г. М. Напалкова, И. И. Корсакова,
Т. П. Пашанина, В. В. Мананков, А. Н. Лобанов***

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Получены антигены *C.burnetii* тремя методами: эфирным, формамидной и ферментной экстракцией. Изучены физико-химические свойства выделенных антигенных комплексов и показана принципиальная возможность получения диагностикумов на их основе.

Ключевые слова: лихорадка Ку, антигены *C.burnetii*, тест-системы, чувствительность, специфичность.

COMPARATIVE EVALUATION OF DIAGNOSTIC PREPARATIONS ON THE BASIS OF THE ANTIGENS OF COXIELLA BURNETII ISOLATED BY DIFFERENT METHODS

***V. P. Smelyansky, S. T. Savchenko, G. M. Napalkova, I. I. Korsakova,
T. P. Pashanina, V. V. Manankov, A. N. Lobanov***

The results of the experiments of constructing diagnostic test-systems on the basis of the antigens of *C.burnetii* are shown. The antigens were isolated by different methods: extraction with the help of formamide, ether and enzymes. Experimental series of diagnostic test-systems were used for detection of antibodies to the agent of Q-fever in human serum.

Key words: Q-fever, antigens *C.burnetii*, test-systems, sensitivity, specificity.

Актуальность проблемы лихорадки Ку связана с широким распространением инфекции среди людей и животных практически во всех странах мира и потенциальной возможностью применения *Coxiella burnetii* в качестве биологического поражающего агента [6]. В связи с разнообразием клинических проявлений и отсутствием патогномоничных признаков заболевания диагностика лихорадки Ку основана на результатах серологических исследований. Регламентированными серологическими методами выявления антител против антигенов коксиелл являются: реакция связывания комплемента (РСК), непрямой метод флюоресцирующих антител (НМФА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФМ) [3, 8, 10]. Сочетанное использование нескольких методов обеспечивает более качественную диагностику лихорадки Ку у больных и наиболее эффективное выявление среди населения лиц, инфицированных *C.burnetii*.

Диагностические возможности перечисленных выше методов различны, чувствительность этих тестов при скрининге антител против *C.burnetii* повышается от РСК к НМФА и ТИФМ. Эффективность серологических тестов зависит от качества получаемых антигенных комплексов возбудителя [1, 7, 9]. Основными этапами получения антигенов (АГ) риккетсий, в частности коксиелл Бернета, являются культивирование их в куриных эмбрионах, инактивация, гомогенизация и центрифугирование. С целью повышения степени очистки и выхода АГ антигенсодержащий материал подвергают дополнительной обработке [2, 5].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка основных свойств антигенов коксиелл Бернета, полученных различными методами, и возможности использования их для конструирования диагностических препаратов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами были получены 2 серии бактериальной массы *C.burnetii* культивированием по Коксу на желточных мешках растущих куриных эмбрионов и выделены АГ коксиелл тремя методами: методом эфирной экстракции, с помощью формамида и с применением ферментов трипсина и папаина. Причем метод формамидной экстракции разработан нами и защищен патентом на изобретение № 2236867 от 27.09.2004 г. [4]. Данный метод получения экспериментальных серий АГ *C.burnetii* прост, доступен, не требует высокоскоростного центрифугирования, многоэтапной очистки, длительного времени и позволяет получить высокий процент выхода конечного продукта. Методом эфирной экстракции освобождали риккетсии от примесей среды культивирования в степени, достаточной для применения АГ в большинстве серологических реакций. В ферментном методе для обеспечения более полного выхода коксиелл и отделения тканевых компонентов желточных мешков использовали метод разрушения с помощью протеолитических ферментов трипсина и папаина. Полученные на основе очищенных антигенных комплексов диагностикумы тестировали на чувствительность и специфичность с сыворотками кроличьими интактными и гипериммунными

антикоксиеллезными. Лучшие экспериментальные серии диагностикумов испытали в РСК, ТИФМ, дот-ТИФМ и НМФА для поиска антикоксиеллезных антител в сыворотках крови людей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами были изучены физико-химические свойства полученных АГ. Установлено, что максимальное количество белка содержится в АГ, выделенных ферментным методом и полученных эфирной экстракцией (1,0—1,1 мг/мл), и минимальное — в препаратах, выделенных формамидом (0,8 мг/мл). Содержание полисахаридов повышается от 0,25 мг/мл при выделении эфиром до 0,37 мг/мл при выделении ферментным методом, а максимальные значения были в АГ, полученных с помощью формамида (0,55 мг/мл). Наибольшее количество липидов обнаружено в АГ, выделенных ферментным методом (10 мг/мл), несколько меньше при формамидной и эфирной экстракции (0,85 и 0,75 мг/мл соответственно). Изучена электрофоретическая подвижность каждого из АГ в геле. Показано, что АГ, полученные формамидной экстракцией, являются электронейтральными, а выделенные с помощью эфира и ферментов — анод-подвижными.

На основе выделенных антигенных комплексов были получены экспериментальные серии диагностических препаратов для поиска специфических антител в РСК, НМФА, ТИФМ и дот-ТИФМ. По результатам тестирования даны рекомендации по их оптимальному применению при конструировании диагностических тест-систем.

При использовании АГ коксиелл Бернета, полученных разными методами, в РСК наибольшую активность показали антигены, выделенные ферментным методом, которые давали положительный результат с разведением сыворотки 1:256, в то время как АГ, выделенные эфиром, только с разведением 1:64. Антигенные комплексы, полученные формамидной экстракцией, обладали антикомплементарностью. При постановке ряда реакций с различными сериями антикоксиеллезных сывороток выявлена наибольшая стабильность результатов РСК на основе АГ, полученных из коксиелл, выращенных в желточных мешках куриных эмбрионов, инактивированных формалином и очищенных от балластных веществ методом эфирной экстракции.

Экспериментальные антигены использовали в качестве сенситивных лунок планшет для ТИФМ и проверяли с гипериммунными антикоксиеллезными сыворотками. В результате было установлено, что тест-система на основе АГ, полученных формамидной экстракцией, выявляет специфические антитела (АТ) в титре 1:512, а при эфирном и ферментном методах в титре 1:256. Перекрестных реакций с АТ к близкородственным микроорганизмам не выявлено ни с одним

из АГ. Поэтому в качестве сорбента лунок стрипов планшет для ТИФМ предпочтительнее использовать АГ, выделенные с помощью формамида или эфира.

Антигены коксиелл Бернета, полученные тремя методами, дополнительно апробировали в качестве сорбентов на нитроцеллюлозных фильтрах (НЦФ) фирмы «Millipor» ($d \text{ пор} = 0,45 \text{ мкм}$) для дот-ТИФМ. После визуализации реакции установлено, что наиболее четкие положительные результаты (пятна темно-коричневого цвета на НЦФ) получены с АГ, выделенными формамидом, при разведении специфической сыворотки 1:256. Аналогичные результаты были с двумя другими антигенными комплексами, но в титре 1:128, поэтому их можно считать равноценными сорбентами для дот-ТИФМ. Перекрестных реакций с АТ к близкородственным микроорганизмам ни с одними из АГ не выявлено. В качестве твердой фазы при постановке дот-ТИФМ рекомендуется использовать НЦФ с сорбционной емкостью по белку не менее 80 мкг/см². Указанным требованиям отвечают мембраны производства фирм «Millipor» и «Synpor» с размером пор 0,22—0,45 мкм.

При апробации различных серий испытуемых антигенов для НМФА с гипериммунными коксиеллезными сыворотками было установлено, что препараты на основе эфирных и формамидных АГ выявляют специфические АТ до титра 1:64—1:128. Тест-система на основе АГ, выделенных ферментной экстракцией, позволяла обнаруживать специфические АТ в разведении сыворотки до 1:256 при четкой специфической флуоресценции на 3—4 креста в люминесцентной микроскопии. Следовательно, для НМФА оптимально подходят именно эти АГ. Перекрестных реакций с АТ к *Rickettsia prowazekii* и *Rickettsia sibirica* не отмечено ни с одним из испытуемых препаратов.

Диагностические тест-системы на основе АГ *S. burnetii*, выделенных тремя методами, были испытаны на чувствительность и специфичность при исследовании сывороток крови людей на наличие АТ к возбудителю лихорадки Ку. Лабораторный анализ 25 проб больных с подозрением на коксиеллез в двух случаях выявил искомые АТ в титрах выше диагностических всеми препаратами, в том числе и коммерческим.

В 86 контрольных сыворотках крови доноров ни в одной из проб АТ к *S. burnetii* не были обнаружены как с испытуемыми препаратами, так и с коммерческой тест-системой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данные экспериментальных исследований позволяют сделать вывод о принципиальной возможности использования тест-систем на основе АГ, полученных формамидной, эфирной и ферментной экстракцией для исследования сывороток крови людей с целью выявления АТ к возбудителю лихорадки Ку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаева Н. М. // Журн. микробиол. — 1991. — №1. — С. 72—75.
2. Лобан К. М., Лобзин Ю. В., Лукин Е. П. Риккетсиозы человека — М., СПб., 2002. — 476 с.
3. Соснина О. Ю. Разработка технологии производства антигена *Soxiella burnetii* для реакции связывания комплемента, метода флюоресцирующих антител и иммунофлюориметрического анализа: дис.... канд. биол. наук. — 1999. — 148 с.
4. Способ получения антигена возбудителя лихорадки Ку /Смелянский В. П., Напалкова Г. М., Пашанина Т. П., Корсакова И. И. // Патент № 2236867 от 27.09.2004 г.
5. Тарасевич И. В. // Клин. микробиол. и анти-микроб. химиотерапия. — 2005. — Т. 7. — № 2. — С. 119—129.
6. Храпова Н. П., Тихонов Н. Г., Жуков А. Н. и др. // Сб. науч. тр.: Природно-очаговые инфек-

ции в Нижнем Поволжье. — Волгоград, 2000. — С. 87—92.

7. Hendrix Z. R., Samuel J E., Mallavia Z. P. // J. Gen. microbial. — 1991. — Vol. 137. — P. 269—276.
8. Hotta A., Zhang G. Q., Andoh M., et al. // Vet. Med. Sci. — 2004. — Vol. 66, № 10. — P. 1289—1291.
9. Maurin M., Raoult D. // Clin. Microbiol. Rev. — 1999. — Vol. 12, № 4. — P. 518—553.
10. Zhang G., Kiss K., Seshardi R., Hendrix Z., et al. // Infec. and Immun. — 2004. — Vol. 72, № 2. — P. 844—852.

Контактная информация

Смелянский Владимир Петрович — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией организации противоэпидемических мероприятий Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

УДК 615.281.014.47:547-304.2-32:547.458.8

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЗОНИАЗИДА И РИФАМПИЦИНА С НЕКОТОРЫМИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Л. П. Овчаренко, Е. В. Компанцева, Г. Г. Израилова

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

На основании результатов исследования динамики изменения относительной вязкости водных растворов некоторых высокомолекулярных соединений в присутствии изониазида и рифампицина обоснована перспективность использования метода вискозиметрии для прогнозирования биодоступности лекарственных веществ. Показана целесообразность использования пектина, метилцеллюлозы (МЦ), натрия карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) в качестве оптимальных наполнителей для создания твердых комбинированных лекарственных препаратов «Изониазида» и «Рифампицина».

Ключевые слова: изучение взаимодействия полимеров и лекарственных веществ, изониазид, рифампицин, вискозиметрия, пролонгирование биофармацевтических свойств лекарственных веществ.

STUDY OF INTERACTION OF ISONIAZID AND RIFAMPICIN WITH SOME HIGH-MOLECULAR COMPOUNDS

L. P. Ovcharenko, E. V. Kompantseva, G. G. Izrailova

On the basis of results of research of dynamics of change of relative viscosity of water solutions of some high-molecular compounds with isoniazid and rifampicin we substantiated a possibility of using a method of viscosimetry for forecasting of bioavailability of medicinal substances. The expediency of using pectin, MS, NaKMS as optimum fillers for development of solid combined medicinal products isoniazid and rifampicin is shown.

Key words: research of interaction of polymers and medicinal substances, isoniazid, rifampicin, viscosimetry, biopharmaceutical properties of medicinal substances.

На основании результатов исследования влияния изониазида и рифампицина на вязкость растворов некоторых высокомолекулярных соединений обоснована перспективность применения вискозиметрии для изучения процессов комплексообразования полимеров и лекарственных веществ в

водных растворах. Полученные результаты представляют интерес для прогнозирования биофармацевтических свойств лекарственных веществ при создании новых лекарственных препаратов, обеспечивающих высокую биодоступность действующих веществ.