

УДК 579.841.95:576.8.071.3

Курчева С.А.

*Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт*

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА
ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУЛЯРЕМИИ**

S. Kurcheva

Stavropol Research Anti-Plague Institute

**ELABORATING BIOTECHNOLOGY FOR PRODUCING
IMMUNODIAGNOSTIC PREPARATIONS FOR TULAREMIA
PATHOGENE DETECTION**

Аннотация. К настоящему времени для диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество эффективных иммунодиагностических тестов. Большая их часть – экспериментальные разработки. В статье приводятся результаты по конструированию иммунобиологических препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя: диагностикумов эритроцитарных, тест-систем иммуноферментных, иммуноглобулинов флуоресцирующих, тест-системы диагностической магнимоносорбентной. Разработана производственная биотехнология изготовления названных диагностикумов, оформлена нормативная документация (регламенты производства, технические условия, инструкции по применению), утвержденная на учрежденческом и федеральном уровнях, что позволяет осуществлять коммерческий выпуск сертифицированных диагностических препаратов.

Ключевые слова: туляремия, диагностика, чувствительность, специфичность, иммунобиологические препараты.

Abstract. So far Russian and foreign scientists have suggested a lot of efficient immunodiagnostic tests, but most of them are only experimental elaborations. The article provides the results of constructing immunobiological preparation data for tularemia pathogen laboratory diagnosis and identification: erythrocytes diagnostic, immunofermment test-systems, fluorescent immunoglobulins, magnoimmunosorbent diagnostic test-systems. Biotechnology of producing the above mentioned preparations has been elaborated and official standard documents (production regulations, technical conditions, usage instructions) have been approved at local and federal levels documents, which permits commercial certificated diagnostic preparations production.

Key words: tularemia, diagnostics, sensitivity, specificity, immunobiological preparations.

Туляремия – природно-очаговая инфекция, относящаяся к особо опасным возвращающимся инфекционным болезням, крупные вспышки и спорадические случаи которой периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе в России. Особенностью эпидемиологии туляремии является большое разнообразие источников носителей, переносчиков, факторов передачи возбудителей, механизмов заражения, входных ворот инфекции [2; 1, 67-76; 4, 249-261].

К настоящему времени для диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество эффективных иммунодиагностических тестов. Однако боль-

шая их часть – экспериментальные разработки [3, 12-15]. Цель исследования – разработка биотехнологии производства иммунобиологических препаратов для идентификации *Francisella (F.) tularensis* и диагностики туляремии.

При производстве диагностических препаратов необходимым условием является получение высококачественного антигенного и антительного материала. Для извлечения наиболее полного антигенного комплекса из микробов с сохранением нативности биополимеров мы избрали щадящий режим дезинтеграции микробных клеток с помощью ультразвуковой установки в сочетании с водно-солевой экстракцией и последующим осаждением белка. Из штаммов *F. tularensis*, относящихся к разным подвидам (*F. tularensis* 543/6 (*mediaasiatica*), *F. tularensis* Schu (*nearctica*) и *F. tularensis* 503/840 (*holarctica*)), этим методом изолирован полигрупповой водорастворимый антиген.

Иммунные туляремиальные сыворотки получили по разработанным нами схемам иммунизации кроликов-продуцентов, используя иммунокорректоры феракрил, тималин, циклофосфан, тимоген, обладающие различным механизмом действия, иммуногеном при этом служил полигрупповой туляремиальный водорастворимый антиген.

До сих пор остаются актуальными и широко используются простые, достаточно чувствительные, не требующие применения специальной аппаратуры и поэтому общедоступные серологические тесты, в частности РНГА, РПГА, РНАт. Нами налажен производственный выпуск диагностикумов эритроцитарных туляремиальных – антигенного и иммуноглобулинового, при этом оптимальная биотехнология их изготовления заключается в следующем: концентрация формализированных эритроцитов – 20 %, температура связывания эритроцитов с сенситином (при его нагрузке в 200 мкг/мл) – полигрупповым водорастворимым белковым туляремиальным антигеном либо иммуноглобулинами класса G (IgG), фракционированными октановой кислотой – 45 °С, рН

раствора – 6,0 в течение 18 ч.

Для получения иммуноглобулинов диагностических туляремиальных флуоресцирующих использовали IgG с концентрацией 10 мг/мл, выделяемые из иммунных сывороток октановой кислотой. Наилучшие серии конъюгатов получены при значении рН реакционной смеси – 9,5, нагрузке ФИТЦ – 20 мг на 1 г белка, температуре 20 °С и четырехчасовом контакте белка с красителем. При использовании высокоактивных IgG, выделенных из туляремиальных гипериммунных сывороток с помощью ПЭГ-6000, получены иммунопероксидазные конъюгаты, рабочий титр которых составил 1:200 – 1:400, чувствительность по водорастворимому антигену – 50-100 нг/мл, по корпускулярному антигену – $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ м.к./мл. Названные конъюгаты входят в «Набор реагентов тест-системы диагностической для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА)», который зарегистрирован в Росздравнадзоре (№ ФСР 2010 /06744).

Важным условием повышения чувствительности и специфичности методов диагностики является селективное концентрирование возбудителя инфекции с последующей постановкой экспресс-анализов, так как чаще всего в исследуемом материале концентрация возбудителя ниже порога чувствительности метода диагностики. С этой целью нами разработаны композиционные магнитные иммуносорбенты на основе поликлональных туляремиальных IgG. В качестве структурных единиц, формирующих остов кремнезема, использовали алюмосиликат, модифицирование поверхности которого осуществляли в присутствии полигликина и вторичного алкилсульфата натрия. Полученный иммуносорбент применен для проведения иммуномагнитной сепарации возбудителя туляремии и детекции его в иммуноферментном анализе, при этом в качестве твердой фазы вместо полистироловых микропланшетов, традиционно используемых при постановке ИФА, применяли разработанный нами магнитоуправляемый иммунный сорбент при постановке «сэндвич»-варианта этого мето-

да. Чувствительность модифицированного ИФА составила $1,0 \times 10^2$ – $1,0 \times 10^3$ м.к./мл., то есть повышалась на два-три порядка по сравнению с общепринятым ИФА.

Применение МИС позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освобождаться от всевозможных примесей, тем самым исключая их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрируя искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа, а также достоверность как положительных, так и отрицательных результатов.

Таким образом, проведенные исследования позволили унифицировать биотехнологию производства иммунобиологических препаратов для идентификации *F. tularensis* и диагностики туляремии, что позволяет наладить их коммерческий выпуск. Полученные

результаты являются основанием для рассмотрения вопроса о внедрении разработанных МИБП в практику работы учреждений санэпиднадзора в условиях повседневной деятельности чрезвычайных ситуаций.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Никифоров, В.В. Туляремия: от открытия до наших дней / В.В. Никифоров, Г.Н. Кареткина // Инф. болезни. 2007. Т. 5, № 1.
2. Олсуфьев, Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии / Н.Г. Олсуфьев. М. : Медицина, 1975. 416 с.
3. Сырова, Н.А. Современное состояние иммунодиагностики туляремии / Н.А. Сырова, З.Л. Терешкина, З.Л. Девдариани // Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 2008. Вып. 97.
4. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques / W.D. Splettstoesser [et al.] // J. Vet. Med. Infect. Dis. Vet. Public. Health. 2005. Vol. 52, № 6.