

условия изготовления эритроцитарного иммуноглобулинового диагностикума чумного: конъюгирующий агентом был определен вторичный алкилсульфат натрия в концентрации 2 %; сенсбилизацию иммуноглобулинов с эритроцитами проводили при температуре 45 °С, при рН 5,0.

Для оценки эффективности сконструированного диагностикума эритроцитарного чумного были проведены межлабораторные испытания экспериментальных серий; при анализе результатов реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) определена чувствительность диагностикума, которая составила для всех исследованных штаммов *Y. pestis* (капсульной и бескапсульной форм) $2,5 \times 10^6$ м.к./мл; также была отмечена высокая специфичность диагностикума, а именно отсутствие реакции со штаммами гетерологичных микроорганизмов.

Следующим этапом стала разработка диагностикума, предназначенного для выявления капсульных и бескапсульных штаммов *Y. pestis* в реакции иммунофлуоресценции (РИФ). Из полученной ранее высокоспецифичной поливалентной гипериммунной сыворотки против *Y. pestis* (капсульной и бескапсульной форм) фракционировали иммуноглобулины класса G каприловым методом. При использовании этого метода в преципитате обнаруживается до 70 % IgG, с незначительным содержанием балластных белков. Были установлены оптимальные параметры конъюгации иммуноглобулинов с ФИТЦ: значение рН — 9,5, количество ФИТЦ — 0,02 г на 1 г иммуноглобулинов, инкубация в течение 4 ч при 20 °С. Оценку специфичности и специфической активности флуоресцирующих чумных антител определяли на мазках, приготовленных из контрольных штаммов гомологичных и гетерологичных микроорганизмов.

Активность (красящий титр) приготовленных меченных чумных иммуноглобулинов флуоресцирующих всех экспериментальных серий равна разведению не менее 1 : 16. Рабочее разведение исследуемых серий позволило выявить капсульную и бескапсульную формы *Y. pestis* в мазках с концентрацией микробных клеток 5×10^5 в 1 мл и более. Для некоторых штаммов оказалось характерным обнаружение единичных бактерий в мазках, приготовленных из взвесей, содержащих $2,5 \times 10^5$ м.к. в 1 мл. Диагностическую ценность флуоресцирующих антител определяли в пробах объектов окружающей среды (смывы с предметов обихода, пробы почвы, гнезда грызунов), искусственно контаминированных возбудителем чумы. При экспериментальном исследовании имитированных проб, содержащих в 1 мл 5×10^5 м.к., выявлены единичные клетки с интенсивным специфическим свечением. При определении специфичности показано отсутствие иммунофлуоресценции в мазках со штаммами гетерологичных микроорганизмов. Таким образом, сконструированные экспериментальные серии при проведении испытаний показали возможность выявлять штаммы возбудителя чумы независимо от формы (капсульной или

бескапсульной) в методе прямой иммунофлуоресценции.

Перспективным способом пробоподготовки исследуемого материала из объектов окружающей среды стало применение иммуномагнитной сепарации. К настоящему времени в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора разработан стандартный образец магносорбента, на его основе был сконструирован чумной магноиммуносорбент.

При проведении предварительной пробоподготовки на МИС в иммуноферментном анализе удалось обнаружить штаммы чумного микроба в концентрации $1,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ м.к./мл (капсульной и бескапсульной форм). Все экспериментальные серии МИС не выявляли в ИФА гетерологичных штаммов в концентрации $1,0 \times 10^5$ м.к./мл и выше. Образовавшийся комплекс «антиген-антитело» выявляли *in vitro* с помощью изготовленного конъюгата пероксидазы хрена с иммуноглобулинами чумными. Для удобства использования была сконструирована экспериментальная тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления *Y. pestis* (капсульных и бескапсульных форм). Возможность детекции чумного микроба и его антигенов в объектах окружающей среды с помощью разработанной тест-системы (путем предварительного избирательного концентрирования на МИС) подтверждена при изучении имитированных проб в рамках межлабораторных испытаний, а также при проведении исследований в полевых условиях.

Результаты проведенных межлабораторных испытаний по изучению эффективности разработанных препаратов представлены в таблице.

Заключение

Вспышки заболеваемости чумой считают проблемой прошлого, однако ежегодно в мире регистрируются случаи заболевания чумой и опасность появления эпидемий чумы сохраняется из-за существования практически на всех континентах обширных природных очагов этой инфекции, где постоянно циркулирует возбудитель.

Для обеспечения эффективного мониторинга за возбудителем чумы в природных очагах необходимо применение надежных методов лабораторной диагностики, обладающих достаточной чувствительностью и специфичностью.

Приведенные в работе данные позволяют сделать заключение, что конструирование диагностических препаратов, ориентированных на выявление капсульных и бескапсульных штаммов возбудителя чумы, является перспективным исследованием, так как у этих препаратов есть дополнительное преимущество — быстро и легко обнаруживать *Y. pestis* в образцах окружающей среды и эктопаразитах. Это имеет большое значение при эпизоотологическом обследовании территории природных очагов чумы и позволяет реализовать возможность обнаружения естественных или генетически модифицированных штаммов *Y. pestis* с отрицательным и/или положительным выражением «фракции I».

Таблица. Результаты испытаний экспериментальных серий чумных диагностикумов (выборочно)

Table. Test results of some experimental plague diagnosticum series

№ п/п	Наименование штамма (наличие «фракции 1») / The name of the strain (presence of «fraction 1»)	Применение / Application					
Производственные штаммы / Production strains							
1.	<i>Y. pestis</i> EV линии НИИЭГ (вакцинный) (F+) / <i>Y. pestis</i> EV strain, Research Institute of Epidemiology and Hygiene line (vaccine) (F+)	выделение «фракции 1» / the allocation of the «fraction 1»					
2.	<i>Y. pestis</i> EV 5 (F-)	выделение водно-солевого экстракта и белков, солюбиризованных карбамидом / Isolation of a water-salt extract and urea solubilized proteins					
Контрольные штаммы / Control strains							
контроль специфической активности / specific activity control ¹							
		в РНГА / in RGA		в РИФ / in RIF		в ИФА с МИС / in ELISA with MIS	
		Серия 1 / Series 1	Серия 2 / Series 2	Серия 1 / Series 1	Серия 4 / Series 4	Серия 2 / Series 2	Серия 5 / Series 5
3.	<i>Y. pestis</i> Yava (F-)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ²
4.	<i>Y. pestis</i> 796 (F-)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	2,5×10 ⁵	2,5×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ³
5.	<i>Y. pestis</i> Harbin (F-)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ³
6.	<i>Y. pestis</i> 461 (F+)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ²	1,0×10 ²
7.	<i>Y. pestis</i> C-726 (F+)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ²	1,0×10 ²
8.	<i>Y. pestis</i> C-563 (F+)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ²	1,0×10 ²
9.	<i>Y. pestis</i> 798 (F+)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	2,5×10 ⁵	2,5×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ³
10.	<i>Y. pestis</i> A-1024 (F+)	2,5×10 ⁶	6,25×10 ⁵	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ²
11.	<i>Y. pestis</i> C-553 (F+)	2,5×10 ⁶	1,25×10 ⁶	5,0×10 ⁵	5,0×10 ⁵	1,0×10 ²	1,0×10 ²
12.	<i>Y. pestis</i> C-529 (F+)	2,5×10 ⁶	1,25×10 ⁶	2,5×10 ⁵	2,5×10 ⁵	1,0×10 ³	1,0×10 ²
контроль специфичности/ specificity control							
13.	<i>Y. enterocolitica</i> 383	-	-	-	-	-	-
14.	<i>Y. enterocolitica</i> 178	-	-	-	-	-	-
15.	<i>Y. enterocolitica</i> 134	-	-	-	-	-	-
16.	<i>Y. enterocolitica</i> 64	-	-	-	-	-	-
17.	<i>E. coli</i> 113-3	-	-	-	-	-	-
18.	<i>E. coli</i> Мк4	-	-	-	-	-	-
19.	<i>E. coli</i> Тк7	-	-	-	-	-	-
20.	<i>S. typhimurium</i> 9640	-	-	-	-	-	-
21.	<i>S. typhimurium</i> 7407	-	-	-	-	-	-
22-27.	<i>Y. pseudotuberculosis</i> I-VI серовары / <i>Y. pseudotuberculosis</i> I-VI serovars	-	-	-	-	-	-

¹ Мутность микробной взвеси определяют в сравнении со стандартным образцом мутности (ОСО 42-28-85П), который откалиброван по международному стандартному образцу.

¹ The turbidity of the microbial suspension is determined in comparison with the standard turbidity sample (ОСО 42-28-85P), which is calibrated according to the international standard sample

Примечание: «-» - отрицательный результат.

Note: “-” - negative results.

**Список литературы
(пп. 1-4, 6 см. References)**

5. Тюменцева И.С., Курчева С.А., Афанасьев Е.Н., и др. Особенности пробоподготовки с использованием иммуномагнитного сорбента при исследовании полевого материала на наличие возбудителя чумы // Военно-медицинский журнал. 2018. № 5. С. 42-46.

7. Тилегул К.А., Алимбекова А., Землянухина Л.С. и др. Динамика заболеваемости чумой в мире // Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева. 2015. № 1. С. 121-125.

8. Божко Н.В., Лебедева С.А., Бичуль О.К. и др. Первичная характеристика свойств и диагностической ценности антигенного комплекса "Фракция V" чумного микроба // Клиническая лабораторная диагностика. 2005. № 6. С. 35.

9. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Щербаков А.А. Оценка возможности использования экспериментальных иммунодиагностических препаратов в лабораторной диагностике чумы и туляремии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14 (2). С. 78-82.

10. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Курчева С.А. и др. Разработка диагностических препаратов для детекции *Yersinia pestis* (капсульной и бескапсульной форм) // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных». 24-25 апреля 2019 г., Ставрополь. С. 289-290.

11. 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. 52–58.

12. Урбах В.Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 1964. 410 с.

References

- Zavialov AV, Berglund J, Pudney AF, et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell*. 2003; 113(5):587-596. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00351-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00351-9)
- Keeling MJ, Gilligan CA. Metapopulation dynamics of bubonic plague. *Nature*. 2000; 407:903-906. DOI: <https://doi.org/10.1038/35038073>
- Cabanel N, Bouchier C, Rajerison M, et al. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51(2):249-254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015>
- Yang R. Plague: recognition, treatment, and prevention. *J Clin Microbiol*. 2017; 56(1):e01519-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01519-17>
- Tyumentseva IS, Kurcheva SA, Afanasiev EN, et al. Features of sample preparation with the use of immunomagnetic sorbent when studying field material for plague agent. *Voенно-Meditsinskii Zhurnal*. 2018; 339(5):42-46. (In Russian).
- 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: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054947>
- Tilegul A, Alimbekova A, Zemlyanukhina LS, et al. Morbidity of plague dynamics in the world. *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbaeva*. 2015; 1(1):121-125. (In Russian).
- Bozhko HV, Lebedeva SA, Bichul OK, et al. Primary characteristics of the properties and diagnostic value of the plague microbe antigenic complex "Fraction V". *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2005; (6):35. (In Russian).
- Voloh OA, Kuznetsova EM, Shcherbakov AA. Assessment of possibility of use of the experimental immunodiagnostic preparations in laboratory diagnostics of plague and tulyaremia. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya*. 2014; 14(2):78-82. (In Russian).
- Tyumentseva IS, Afanasiev EN, Kurcheva SA, et al. Development of diagnostic preparations for the detection of *Yersinia pestis* (capsule and capsule-free forms): Proceedings of the III All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation "Urgent Problems of Zoonotic Infectious Diseases", Stavropol, 24-25 April 2019. pp. 289-290. (In Russian).
- Tyumentseva IS, Afanasiev EN, Startseva OL, et al. Development of standard conditions for the biotechnology of production of immunomagnetic sorbent for express-diagnostics of dangerous infectious diseases. *Tekhnologii Zhivyykh Sistem*. 2017; 14(2):52-58. (In Russian).
- Urbach VYu. Biometric methods. Moscow: Nauka Publ. 1964. 410 p. (In Russian).

Контактная информация:

Курчева Светлана Александровна, заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
e-mail: stavnipchi@mail.ru

Corresponding author:

Svetlana A. Kurcheva, Head of the Scientific and Production Laboratory of Drugs for Diagnosis of Particularly Dangerous and Other Infections, Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
e-mail: stavnipchi@mail.ru

Статья получена: 20.08.2019
Принята в печать: 06.04.2020

