

УДК 616.9; 616-093

DOI: 10.14427/jipai.2023.4.15

Эритроциты как биологические носители и их обработка при конструировании диагностикума для выявления сывороточных мелиоидозных антител в реакции непрямой гемагглютинации

Д.Л. Терешко, М.Я. Кулаков, Л.А. Рябина, И.В. Новицкая

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Волгоград

Erythrocytes as biological carriers and their processing when constructing IHA diagnosticum for detecting melioidosis antibodies in serum

D.L. Tereshko, M.Ya. Kulakov, L.A. Ryabinina, I.V. Novitskaya

Volograd Plague Control Research Institute of Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Аннотация

Целью настоящего исследования явилось повышение эффективности связывания поверхности бионосителя при конструировании эритроцитарных диагностикумов, обеспечивающее возрастание чувствительности реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

При производстве антигенного мелиоидозного диагностикума для РНГА на этапе обработки формализированных бараньих эритроцитов наряду с танином был дополнительно использован алкилсульфат натрия (SDS). Совместное применение этих активаторов способствует значительному возрастанию связывающей способности эритроцитарного носителя, что позволило повысить чувствительность РНГА-диагностикума в 2-4 раза. Показана возможность использования полученного препарата при выявлении мелиоидозных антител в сыворотках как иммунизированных, так и больных мелиоидозом экспериментальных животных.

Ключевые слова

Эритроциты, РНГА-диагностикум, танин, алкилсульфат натрия, мелиоидоз.

Введение

Особо опасные инфекционные заболевания в современных условиях в связи с актуализацией их угрозы общественному здоровью приобрели особую значимость. При этом современная диагностика особо опасных инфекций должна опираться на высокоспецифичные и чувствительные методы, которые позволили бы получать воспроизводимые и достоверные результаты [1,2].

Summary

The aim of this study was to increase the efficiency of biocarrier surface binding when constructing erythrocyte diagnosticums, providing for an improvement in indirect hemagglutination test (IHA) sensitivity. In the production of antigenic melioidosis diagnosticum for IHA, sodium alkylsulfate (SDS) was additionally used along with tannin at the stage of processing formalinized sheep erythrocytes. The combined use of these activators contributes to a significant rise of binding capacity of the erythrocyte carrier, which made it possible to increase the sensitivity of the IHA-diagnosticum 2-4-fold. The possibility of obtained preparation use for detection of melioidosis antibodies in sera of both immunized and animals with melioidosis was shown.

Keywords

Erythrocytes, IHA-diagnosticum, tannin, sodium alkylsulfate, melioidosis.

В связи с напряжением ситуации на международном уровне возрастает вероятность завоза в Россию различных опасных инфекций, в частности, мелиоидоза, признаки которого не отличаются специфичностью и при этом малознакомы врачам-клиницистам и персоналу клинических лабораторий. Возможно, отсутствие клинической настороженности и при этом недостаточное развитие в нашей стране лабораторной базы для диа-

гностики мелиоидоза обуславливают обстоятельства, согласно которым в России до настоящего времени не зарегистрировано ни одного случая этого заболевания [3].

Лабораторные исследования при диагностике мелиоидоза традиционно осуществляют по двум направлениям: выделение и идентификация чистой культуры возбудителя с последующим изучением его свойств и обнаружение маркеров микроорганизма с помощью некультуральных методов исследования [4].

Несомненно, культуральный метод остаётся «золотым стандартом» инфекционной диагностики, однако в отношении *B. pseudomallei* он ограничен. Это связано, прежде всего, со значительным полиморфизмом возбудителя, его способностью формировать различные существенно отличающиеся между собой морфотипы колоний, условий культивирования микроорганизма, а также используемых питательных сред и селективных добавок [5].

В таких случаях неоценимую помощь могут оказать некультуральные методы – прежде всего, ПЦР и иммуноанализ [6]. Среди последних до настоящего времени не теряют актуальности агглютинационные тесты, основанные на взаимодействии антител с антигеном, имеющим корпускулярную основу, что, согласно теории Маррека, приводит к образованию решётчатых конгломератов, легко различимых даже при обычном визуальном контроле. В случае, когда основу узлов агглютинационной решётки представляют эритроциты, имеющие изначально относительно крупные размеры и насыщенный цвет, визуализация результатов реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) ещё более облегчается, и учёт реакции становится более чётким и достоверным. При этом определение наличия антител в биологических жидкостях с помощью эритроцитарных диагностикумов происходит независимо от видовой принадлежности иммуноглобулинов, что делает РНГА в определённой степени универсальным методом иммуноанализа [7].

В практической работе РНГА отличают такие значимые для иммунодиагностики характеристики, как экспрессность, специфичность, экономичность, методическая простота выполнения. Такие особенности реакции гемагглютинации позволили ей получить широкое распространение в лабораторной диагностике многих нозологий, включая особо опасные вирусные лихорадки, глубокие микозы, паразитарные заболевания или инфекции бактериальной этиологии [4,8].

В схеме лабораторной диагностики мелиоидоза регламентировано использование РНГА на

этапах экспресс- и ускоренного анализа проб, а также идентификации культур. Решение задач, оказывающих влияние на повышение качества используемых препаратов, неизменно будет связано с усовершенствованием лабораторной диагностики мелиоидоза в целом [9].

Доказано, что биологические носители (как, например, эритроциты барана) с высокой эффективностью адсорбируют на своей поверхности белковые и белково-полисахаридные комплексы [10]. Как известно, эритроциты представляют собой эластичные безъядерные двояковогнутые клетки, клеточная стенка которых отличается определённой химической структурой, позволяющей ей достаточно легко образовывать ковалентные связи с различными биомолекулами. С другой стороны, выраженная складчатость мембраны эритроцита обеспечивает значительное увеличение площади связывающей поверхности бионосителя, а при различных физических воздействиях – сохранность клетки в целом. При этом способность клеточной стенки менять молекулярную упорядоченность и внутримембранное распределение своих белков и липидов (фосфолипидов, сфингомиелина, полиненасыщенных жирных кислот, холестерина и др.) стабилизирует мембрану эритроцита и обеспечивает ей возможность в течение длительного времени существовать в равновесном ненапряжённом состоянии, сохраняя свои микровязкостные свойства и определённый уровень текучести [11].

Всё это в целом позволяет эритроцитарной клетке стать уникальным и не имеющим себе равных бионосителем различных иммунореагентов.

Исследования по совершенствованию качества эритроцитарных антигенных диагностикумов могут быть проведены по нескольким направлениям: получение высокоочищенных препаратов антигенов, использование полифункциональных конъюгирующих компонентов, варьирование отдельных этапов сенсibilизации носителя, модификация условий постановки реакции, разработка способов повышения специфической активности и сохранности наборов реагентов и т.д. [12].

В этом ряду исследований подготовка носителя представляется нам одним из наиболее значимых аспектов такой работы. Для обработки поверхности эритроцита используют различные вещества, которые повышают сорбционные свойства эритроцитарной клетки.

Танин – фенольное соединение растительного происхождения, которое приобрело наиболее широкое распространение в практике. Танин обладает выраженным дубящим действием, так как он

за счёт большого количества гидроксильных групп формирует прочные химические связи с различными биополимерами и осаждает многие белки, что в целом уплотняет и стабилизирует клеточную мембрану. В конечном итоге под действием танина изменяется осмотическая резистентность, а также скорость оседания эритроцитов и увеличивается уровень их агглютинабельности [13].

При конструировании эритроцитарных диагностикумов с целью ещё большего повышения ёмкости сорбента и последующего формирования высокоаффинных связей между иммунореагентами также используют различные поверхностно-активные вещества (алкилсульфат натрия, додецилсульфат натрия (SDS), глутаровый альдегид, гидрохинон и др.) [14], отличающиеся способностью дестабилизировать билипидный слой клеток, делая мембрану более подвижной, а за счёт своей высокой молекулярной массы обеспечивающие более термодинамически устойчивую систему носитель-сенситин.

Источником алкилсульфата натрия, по отдельным наблюдениям, может служить концентрированное жидкое моющее средство «Прогресс» (ООО АМС «Медиа», г. Лосино-Петровский Московской обл., ТУ 2383-018-52662802-2002) в смеси с 0,25% раствором очищенного додецилсульфата натрия. Использование данного метода при производстве бруцеллёзного эритроцитарного антигенного диагностикума позволило выявить специфические антитела в стандартном образце сыворотки в титре РНГА 1:1600 [15].

Не менее важным и сложным в получении эритроцитарных диагностикумов является осуществление самого процесса гемосенсибилизации. На эффективность нагрузки эритроцитов сенситином влияют многие параметры, в том числе такие, как рН, содержание белка в растворе, температура, длительность и условия контакта компонентов.

В ходе сенсибилизации эритроцитов одним из наиболее значимых этапов является подбор оптимальной дозы сенситина, которая позволила бы как не допустить избыточной концентрации белка, приводящей к неспецифической агглютинации, так и избежать его недостаточной нагрузки, не позволяющей в полной мере реализовать аналитические и диагностические свойства препарата [16].

Таким образом, эффективная обработка носителя в ходе конструирования эритроцитарного диагностикума является одним из основополагающих аспектов производства, который обеспечивает получение препарата с высоким уровнем специфической активности.

Цель исследования. Повышение эффективности связывания поверхности бионосителя при конструировании эритроцитарных диагностикумов, обеспечивающее возрастание чувствительности РНГА, используемой для определения титра сывороточных мелиоидозных антител.

Материалы и методы

Все работы были проведены с соблюдением санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21.

Объектами исследования служили: штаммы *B. pseudomallei* 56830, С-141, 100, 57576, 60839, а также гипериммунные козы сыворотки, формализированные бараны эритроциты, танин, алкилсульфаты натрия.

Формализацию эритроцитов проводили по стандартной методике [17].

В качестве источника антигенного комплекса для сенсибилизации эритроцитов использовали водно-солевой экстракт штамма *B. pseudomallei* 56830 [18], содержащий преимущественно белково-полисахаридный комплекс антигена 8, который получали методом формамидной экстракции по Fuller [19] в модификации Н.Н. Пивень с соавт. [20].

Гипериммунные мелиоидозные сыворотки получали путём многоциклового введения экспериментальным животным (козлам) взвеси инактивированных клеток возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* 56830 в возрастающих концентрациях от 1×10^9 до 1×10^{10} м.к./животное в смеси с полным адьювантом Фрейнда (1:1 по объёму).

Для получения мелиоидозных сывороток переболевших животных неинбредных белых мышей заражали внутривенно различными штаммами *B. pseudomallei* в дозах 2-4 LD₅₀. Забор сывороток осуществляли на 14-28 дни заболевания.

Активность сывороток оценивали методами радиальной иммунодиффузии и РНГА с эритроцитарным антигенным мелиоидозным диагностикумом.

В качестве модифицирующей поверхность эритроцитов агентов использовали водные растворы традиционно используемого танина (0,025%), а также додецилсульфата натрия в варьирующих концентрациях (2,5%; 2%; 1,5%; 1,25%; 1%; 0,8%; 0,7%; 0,6%).

С целью конструирования диагностикума эритроциты барана взвешивали в буфере Зернсена (рН 5,9), разливали по центрифужным стаканам, куда добавляли навески активизирующих агентов – танина и додецилсульфата натрия в соответствующих концентрациях, после чего каждую из смесей инкубировали при 45°C в течение 25 минут на водяной бане. Затем обработанные эритроциты отмывали в буфере Зернсена (рН 5,9) и загружали поверхность бионосителей антигенами водно-со-

левого экстракта *B. pseudomallei* 56830 в концентрациях 0,1 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,4 мг/мл и 2 мг/мл.

Специфическую активность отдельных серий диагностикума оценивали по результатам РНГА как с сыворотками гипериммунных, так и переболевших мелиоидозом лабораторных животных.

Результаты и обсуждение

Первые опыты были ориентированы на подбор оптимальной дозы додецилсульфата натрия (SDS) как активатора бионосителя и сравнение результатов с данными, полученными при производстве мелиоидозного антигенного диагностикума на основе эритроцитов, обработанных танином в конечной концентрации 0,025%. При этом мы учитывали тот факт, что химически чистый алкилсульфат натрия в высоких концентрациях обладает лизирующим действием на клеточные мембраны, в то время как фирмы-производители при изготовлении детергентов используют добавки, косвенно влияющие на взаимодействие алкилсульфатов с мембранными структурами, в связи с чем нами было принято решение сравнить использование химически чистого алкилсульфата – додецилсульфата натрия (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) [15] – и препарата вторичного алкилсульфата натрия в форме средства «Прогресс»TM [15].

Результаты по влиянию танина и додецилсульфата натрия на специфическую активность эритроцитарного диагностикума при двукратном изменении нагрузки сенситина представлены ниже (табл. 1).

Как следует из табличных данных, обработка формализированных эритроцитов традиционно используемым танином позволяла получить стабильные результаты при чётких отрицательных контролях реакции, при этом титр иммунной козьей мелиоидозной сыворотки составлял 1:3200. При использовании для обработки эритроцитов SDS в концентрации (1,25-1,5)% чувствительность РНГА возрастала в 2-4 раза, при этом контроли чётко демонстрировали специфичность диагностикума. Снижение концентрации SDS до 1% и ниже не показало преимуществ перед танином, что с учётом стоимости обоих препаратов экономически оказывается нецелесообразным. Напротив, более высокое содержание SDS в растворе (2-2,5% и выше) провоцирует спонтанную агглютинацию эритроцитов, что не даёт возможности выполнять РНГА. Таким образом, оптимальное значение дозы додецилсульфата, используемого в качестве агента, активирующего поверхность эритроцитов, при нагрузке сенситина как 0,2, так и 0,4 мг/мл, составляет (1,25-1,5)%.

Таблица 1. Результаты РНГА с мелиоидозным антигенным эритроцитарным диагностикумом, сконструированным на основе формализированных эритроцитов, обработанных различными активирующими агентами

Активатор поверхности бионосителя	Концентрация активатора	Доза сенситина* (мг/мл)	Титр гипериммунной сыворотки в РНГА**												
			1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	К	К	
Танин	0,025%	0,4	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
Танин	0,025%	0,2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	2,5%	0,4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SDS	2,5%	0,2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SDS	2,0%	0,4	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SDS	2,0%	0,2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
SDS	1,5%	0,4	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-
SDS	1,5%	0,2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-
SDS	1,25%	0,4	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-
SDS	1,25%	0,2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-
SDS	1,0%	0,4	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	1,0%	0,2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,75%	0,4	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,75%	0,2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,5%	0,4	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,5%	0,2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,25%	0,4	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS	0,25%	0,2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечания: * – Сенситином при производстве эритроцитарного мелиоидозного антигенного диагностикума являлся водно-солевой экстракт *B. pseudomallei* 56830; ** – За титр сыворотки принимали последнее разведение в лунках с положительным результатом РНГА (на «3+» и «4+» по общепринятым принципам учёта реакции); «-» – отрицательный результат реакции («2+» и ниже).

Попытка совместного последовательного использования для обработки поверхности носителя обоих активирующих агентов (0,025% танин, затем 1,25% SDS или 1,25% SDS, затем танин 0,025%), хотя приводила к возрастанию длительности производства, принципиально не изменяла характеристик получаемого препарата даже в условиях увеличения дозы сенситина до 0,8 мг/мл.

Известно, что на молекулярном уровне гидролизующие танины хорошо связываются с заряженными группами белков и липидов, а также способны влиять на физические свойства мембран, регулировать клеточный метаболизм, устанавливать связь между соседними поверхностями бислоев, инициировать агрегацию мембранных полипептидов [14].

В отличие от танина, додецилсульфат натрия, как и большинство синтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ), специфически взаимодействует с белками мембран путём образования ионных и гидрофобных связей. Именно ионные реакции находятся в основе эффективной очистки некоторых природных мембранных белков при их обработке малыми количествами SDS [14].

В отличие от белков, взаимодействие додецилсульфата натрия с липидами выражено слабее, за счёт чего такие воздействия требуют более высоких концентраций несвязанного SDS. Однако мицеллы додецилсульфата натрия способны образовывать молекулярный комплекс с частицами холестерина путём образования химических связей между гидроксильными группами стероида и концевыми алифатическими остатками в молекулах детергента. Такое взаимодействие аналогично поведению холестерина в фосфолипидных бислоевых мембранах, когда стерол проникает своей циклической частью в пространство между гидрофобными «хвостами» фосфолипидных молекул и ориентируется к мембране преимущественно ортогонально [21].

С учётом различий в механизмах активирующего действия на мембрану эритроцитов танина и SDS нами была проведена серия опытов по одномоментному использованию обоих химических агентов. Результаты представлены в табл. 2.

Результаты опытов по одновременной танизации и SDS-алкилированию эритроцитов аналогичны данным, полученным в ходе последовательного использования модифицирующих поверхность эритроцита веществ, при этом значительно сокращается время активации бионосителей, что, несомненно, является технологическим преимуществом при выполнении отдельных этапов производства.

Наряду с химически чистым препаратом алкилсульфата натрия нами было апробировано описанное в литературе применение с целью модификации поверхности эритроцитов раствора неочищенного алкилсульфата натрия, представленного в составе мощного средства «Прогресс» в конечных концентрациях от 1% до 7%. Аналогично опытам по изучению активирующих характеристик SDS были определены оптимальные дозы и условия активации мембран эритроцитов неочищенным детергентом с последующей сенсibiliзацией носителя водно-солевым экстрактом *B. pseudomallei* 56830 (0,2 мг/мл). Результаты представлены ниже (табл. 3).

Как видно из табличных данных, оптимальной является концентрация вторичного алкилсульфата натрия в растворе 4-5%, которая, с одной стороны, позволяет на выходе получить препарат с высокой аналитической чувствительностью, с другой – избежать спонтанной агглютинации нагруженных эритроцитов. Следует отметить, что полученные результаты были подтверждены серией проведённых опытов и отличались высокой воспроизводимостью.

В дальнейшем для последующей работы была использована концентрация вторичного алкилсульфата натрия на уровне 5%, танина – 0,25%.

Для определения оптимальной сенсibiliзирующей дозы сенситина, которым являлся водно-солевой экстракт (ВСЭ) *B. pseudomallei* 56830, были исследованы дозы нагрузки по белку 2 мг/мл, 1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,25 мг/мл (табл. 4).

Как следует из представленных данных, одновременная активация танином (0,025%) и вторичным алкилсульфатом натрия (5%) увеличивает сорбционную ёмкость поверхности эритроцита, что в конечном итоге способствует повышению чувствительности РНГА-диагностикума. Следует отметить, что такая тенденция прослеживается при всех изученных дозах нагрузки сенситина.

При этом оказалось, что различия в активности полученных препаратов при активации мембраны эритроцитов химически чистым додецилсульфатом и его неочищенным аналогом практически отсутствуют, что делает использование вторичных алкилсульфатов натрия не менее эффективным, но по сравнению с дорогостоящими высокоочищенными алкилсульфатами (додецилсульфатом натрия/лаурилсульфатом натрия – SDS) значительно экономически более выгодным. Более того, как нам кажется, действие на эритроцитарную мембрану реагентов мощного средства «Прогресс» (ООО АМС Медиа, г. Лосино-Петровский, Московская обл.; ТУ

Таблица 2. Результаты РНГА с мелиоидозным эритроцитарным диагностикумом, полученным при одновременной активации эритроцитов танином (0,025%) и додецилсульфатом натрия (1,25%)

Доза (мг/мл)*	Титр гипериммунной сыворотки**										К	К
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400		
0,8	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-
0,4	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-
0,2	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-

Примечания: * – Сенситивом при производстве эритроцитарного мелиоидозного антигенного диагностикума являлся водно-солевой экстракт *B. pseudomallei* 56830; ** – За титр сыворотки принимали последнее разведение в лунках с положительным результатом РНГА (на «3+» и «4+» по общепринятым принципам учёта реакции); «-» – отрицательный результат реакции («2+» и ниже).

Таблица 3. Подбор концентрации вторичного алкилсульфата натрия, используемого для активации эритроцитов

Активирующий агент	Концентрация	Титр гипериммунной сыворотки**											К	К
		1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400			
Вторичный алкилсульфат натрия*	1%	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	
	2%	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	
	3%	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	
	4%	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	-	-	-	-	
	5%	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	-	-	-	
	6%	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	
	7%	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	3+	
Танин	0,025%	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	

Примечания: * – Вторичный алкилсульфат натрия присутствовал в составе моющего средства «Прогресс»; ** – За титр реакции принимали последнее разведение с положительным результатом РНГА в лунках (на 3+ и 4+ по общепринятым принципам учёта реакции); «+» – положительный результат реакции «-» – отрицательный результат реакции.

Таблица 4. Результаты РНГА при использовании различных схем активации эритроцитов

Активатор*	Доза ВСЭ** (мг/мл)	Титр гипериммунной сыворотки в РНГА***											К	К
		1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400			
Танин	2	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,5	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	0,25	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Танин / вторичный алкилсульфат натрия	2	4+	4+	4+	3+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	
	1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	
	0,5	4+	4+	4+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	
	0,25	4+	4+	4+	3+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	
Вторичный алкилсульфат натрия	2	4+	4+	4+	3+	3+	-	-	-	-	-	-	-	
	1	4+	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	
	0,5	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	
	0,25	4+	4+	4+	4+	3+	-	-	-	-	-	-	-	

Примечания: * – Концентрации танина и вторичного алкилсульфата натрия составляли 0,025% и 5% соответственно; ** – Антигеном для сенсibilизации эритроцитов являлся ВСЭ *B. pseudomallei* 56830; *** – За титр реакции принимали последнее разведение в лунках, где зарегистрирован положительный результат РНГА (на «3+» и «4+» по общепринятым принципам учёта реакции); «-» – отрицательный результат РНГА; К – отрицательный контроль.

Таблица 5. Результаты РНГА при выявлении мелиоидозных антител в сыворотках заражённых белых мышей

Штаммы микроорганизмов	LD ₅₀ (м.к.)	Титр сывороток в РНГА*									К	К
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:6400	1:12800			
<i>B. pseudomallei</i> 56830	2×10 ³	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	+	-	-	
<i>B. pseudomallei</i> 100	10 ¹	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-	-	
<i>B. pseudomallei</i> C-141	10 ⁴	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+				

Примечание: * – За титр реакции принимали последнее разведение с положительным результатом РНГА в лунках (на «3+» и «4+» по общепринятым принципам учёта реакции); «-» – отрицательный результат реакции; К – отрицательный контроль.

2383-018-52662802-2002; ГОСТ Р51696-2000), в состав которого, кроме поверхностно-активных веществ алкилсульфатного ряда, входят в минимальных концентрациях различные добавки (загустители, отдушки и т.д.), не снижая качества используемых алкилсульфатных солей натрия, может оказаться даже более мягким и щадящим.

Экспериментальные серии эритроцитарного антигенного мелиоидозного диагностикума также были исследованы в РНГА на моделях экспериментального мелиоидоза с сыворотками заражённых белых мышей (табл. 5).

Использованный в РНГА диагностикум был сконструирован на основе формализированных эритроцитов, поверхность которых одновременно была обработана танином (0,025%) и вторичным алкилсульфатом натрия (5%), после чего сенсibilизирована водно-солевым экстрактом *B. pseudomallei* 56830 в концентрации последнего по белку 0,5 мг/мл.

Представленные в таблицах данные подтверждают возможность с помощью полученного антигенного диагностикума выявлять антитела в сыворотках не только иммунизированных, но и больных и переболевших мелиоидозом лабораторных животных. При этом чувствительность диагностикума, в ходе конструирования которого поверхность носителя обрабатывают комплексным активатором, становится в 2-4 раза выше по сравнению с таковой при использовании каждого из компонентов в отдельности. Стабильность отрицательных контролей демонстрирует отсутствие спонтанной агглютинации при всех концентрациях сенситина, что свидетельствует о полноценном вовлечении поверхностных структур эритроцитарной мембраны в формирование высокоаффинных связей с антигенами водно-солевого экстракта возбудителя мелиоидоза.

Литература

1. Белозеров Е.С., Киселева Л.М., Мидленко В.И. и соавт. Инфекционные болезни и проблемы биологической безопасности. Ульяновский медико-биологический журнал. 2016; 3: 8-15.
2. Щербаква С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. и соавт. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней как аспект биологической безопасности. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2016; 1 (14): 47-52.
3. Захарова И.Б., Топорков А.В., Викторов Д.В. Мелиоидоз и сепс: современное состояние проблемы и актуальные вопросы эпидемиологического надзора. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018; 6: 103-109. DOI: 10.36233/0372-9311-2018-6-103-109
4. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Пакскина Н.Д. и соавт. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. 2009.

Заключение

Таким образом, эритроциты за счёт своих биологических свойств могут быть с высокой эффективностью использованы для конструирования на их основе востребованных в практике средств лабораторной диагностики различных инфекционных заболеваний.

При производстве эритроцитарного мелиоидозного антигенного диагностикума для активации поверхности бионосителя с целью повышения его адсорбционной ёмкости нами были использованы танин и алкилсульфат натрия (последний – как в виде высокоочищенного препарата SDS, так и в форме вторичных соединений алкилсульфатного ряда, входящих в состав моющего средства «Прогресс»). Дополнительная обработка формализированных и танизированных эритроцитов алкилсульфатными соединениями, по-видимому, активизирует добавочные мембранные мишени, что в конечном итоге способствует более прочному связыванию сенситина с носителем. В целом, такая аранжировка этапов конструирования иммунопрепарата дала возможность увеличить чувствительность мелиоидозного антигенного эритроцитарного диагностикума от 1:3200 до 1:12800.

Следует отметить, что одномоментное применение этих реагентов позволило в значительной степени сократить время производства, при этом наряду с возрастанием (в 2-4 раза) чувствительности сконструированный препарат отличался стабильностью и демонстрировал воспроизводимость результатов РНГА при выявлении сывороточных мелиоидозных антител как у подвергнутых длительной иммунизации животных, так и при моделировании экспериментального мелиоидоза.

5. Fairley L., Smith S., Maisrikrod S. et al. Systematic review and meta-analysis of diagnostic tests for diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica*. 2021; 214: 105784. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105784
6. Settles E.W., Sonderegger D., Shannon A.B. et al. Development and evaluation of a multiplex serodiagnostic bead assay (BurkPx) for accurate melioidosis diagnosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2023; 17(2): e0011072. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011072
7. Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В. и соавт. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуберкулезных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(10): 630-635. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-636
8. Новицкая И.В., Прохвятилова Е.В., Топорков А.В. и соавт. Диагностические возможности эритроцитарного

иммуноглобулинового диагностикума для выявления и идентификации возбудителей особо опасных (глубоких) микозов. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов. 2017; 3: 75-79.

9. Методические указания МУ 4.2.3744-22 «Лабораторная диагностика мелиоидоза и сапа. Организация и проведение в лабораториях различного уровня» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 14 марта 2022 г.).

10. Анненков В.В., Лещук С.И., Попкова С.М. и соавт. Современные подходы к конструированию препаратов в иммунотехнологии. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2004; 9: 50-54.

11. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г. и соавт. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза. Acta Biomedica Scientifica. 2010; 3: 334-354.

12. Лещук С.И., Сердюк Л.В., Попкова С.М. и соавт. Новые технологии в создании иммунодиагностикумов для РНГА. Современные наукоемкие технологии. 2010; 7: 99-101.

13. Borisova M.P., Kataev A.A., Mavlyanov S.M. et al. Effects of hydrolysable tannins on native and artificial biological membranes. Biochemistry (Biokhimiya). Supplemental Series A, Membrane and Cell Biology. 2015; 9 (1): 53.

14. Мельник Н.В., Крюкова Е.Н., Литенкова И.Ю. и соавт. Эритроцитарные диагностикумы и применение в ветеринарии. Ветеринария Кубани. 2017; 3: 15-17.

15. Патент №2667121 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/569. Способ получения бруцеллезного эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) : № 2016142827 : заявл. 31.10.2016 : опубл. 14.09.2018 / О.Ю. Юсупов, М.М. Микаилов, А.А. Халиков и др. ; заявитель Федеральное государственное бюджетное научное

учреждение «Прикаспийский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт».

16. Патент №2540902 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/531, А61К 39/104. Способ получения антигенного эритроцитарного диагностикума для обнаружения антител к антигенам возбудителей сапа и мелиоидоза: № 2013135369/15 : заявл. 26.07.2013 : опубл. 10.02.2015 / А.М. Куделина, И.В. Новицкая, М.Я. Кулаков и др. ; заявитель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

17. Авторское свидетельство № 649434 А1 СССР, МПК А61К 35/18. Способ обработки эритроцитов : №2365827 : заявл. 01.06.1976 : опубл. 28.02.1979 / И.Я. Мошиашвили ; заявитель Московский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

18. Патент №2004251 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/02. Способ выделения антигена 8 возбудителя мелиоидоза : №04942088 : заявл. 04.06.1991 : опубл. 15.12.1993 / Н.П. Храпова, В.И. Смирнова, Н.Н. Пивень и др. ; заявитель Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт.

19. Fuller A.T. The formamide method for the extraction of polysaccharides from haemolytic streptococci. British Journal of Experimental Pathology. 1938;19 (2):130.

20. Смирнова В.И., Пивень Н.Н., Плеханова Н.Г. и соавт. Оптимизация технологии получения антигена 8 возбудителя мелиоидоза. Информационный бюллетень. Саратов; 1994: 33-34.

21. Pavlyukov M.S., Gulin A.A., Astafiev A.A. et al. Lateral heterogeneity of cholesterol distribution in cell plasma membrane: investigation by microfluorimetry, immunofluorescence, and TOF-SIMS. Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2019; 13(1): 50-57.

Сведения об авторах

Терешко Дмитрий Леонидович научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: dltereshko@gmail.com

Кулаков Михаил Яковлевич к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Рябинина Любовь Анатольевна научный сотрудник лаборатории иммунодиагностических препаратов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: lyubov-vtm@yandex.ru

Новицкая Ирина Вячеславовна к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, зав. отделом иммунологии и экспериментального производства МИБП ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: irvnov@mail.ru

Поступила 23.06.2023.