

На правах рукописи



Касторная Маргарита Николаевна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ЭКСПРЕССНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ
БРУЦЕЛЛЕЗА И ДЕТЕКЦИИ ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЕЙ**

**03. 00. 23 - биотехнология
03. 00.07.- микробиология**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Краснодар, 2003

Работа выполнена в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте МЗ РФ

Научные руководители: доктор медицинских наук
Афанасьев Евгений Николаевич;
доктор медицинских наук, профессор
Тюменцева Ирина Степановна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Шевченко Александр Алексеевич;
доктор медицинских наук, профессор
Пожарская Виктория Олеговна

Ведущая организация – Ставропольский государственный технический университет (г. Ставрополь).

Защита состоится «17» июля 2003 г. в 9.00 часов
на заседании диссертационного совета Д. 220. 038. 09 при Кубанском
государственном аграрном университете (350044, Краснодарский
край, г. Краснодар, ул. Калинина, 13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Краснодарского
государственного аграрного университета.

Автореферат разослан «14» июля 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Чернышева

2003-A
11623

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. В последние годы во всем мире отмечается рост заболеваемости бруцеллезом, особенно в районах развитого овцеводства (Губина, Маликов, 1989; Воробьев, Черкасский, Степанов, 1997; Онищенко, 2001; Покровский, Филатов, Шаханина, 2001; Gavazzi, Prigeut, Baudet et al., 1997; Sun, Zhang, Sun, 1998; Handa, Singh, Sing et al., 1998; Cerri, Ebani, Pedrini et al., 1999 и др.). Зависимость поражения этой инфекцией сельскохозяйственных животных прямо пропорциональна частоте случаев заболеваемости бруцеллезом людей (Вершилова, 1973; Ковалев, Петров, Богданов и др., 1997; Баташев, Уралева, Кучин и др., 1998; Schopf, Khaschabi, 1997; Miller, Adams, Ficht et al., 1999; Sanchez Chaparro, Merida de la Torre, Gonzalez Alegre et al., 1999; Milionis, Christou, Elisaf, 2000 и др.).

В России проблема бруцеллеза стоит достаточно остро, так как заболевания людей и животных регистрируются ежегодно практически на всех её административных территориях. Почти 90% заболевших людей бруцеллезом приходится на территории Северо-Кавказского (Карачаево-Черкесская Республика и Дагестан), Поволжского (Волгоградская и Саратовская области), Западного и Восточно-Сибирского (прежде всего Челябинская область) регионов. Наиболее пораженным бруцеллезом регионом является Ставропольский край, где показатели заболеваемости населения края превышают среднероссийские в 9-15 раз (Гнутов, Богданов, Постовой и др., 1995; Лямкин, Таран, Бутаев, 2001).

Использование специфической вакцинации привело к изменению иммунологического фона в сторону гиперсенсibilизации населения к бруцеллезному антигену, клинической картины болезни и эпидемиологического процесса в целом (Вершилова, Голубева, 1972; Ельников, Ангелов, Юндин и др., 1987; Панова, Мансурова, 1998; Kumar, Singh, Barbuddne, 1997). Появились сведения по клинике бруцеллеза у лиц различного профессионального состава, не всегда укладывающиеся в общепринятую патогенетическую схему (Панова, Мансурова, 1998; Баташев, Уралева, Кучин и др., 1998; Цирельсон, Салов, Сыздыков, 1999; Palanduz, Palanduz, Guler et al., 2000).

Особенности клинического течения бруцеллеза, тенденции к хронизации процесса, его полиморганотропность и сменяемость поражений, обуславливающих полиморфизм клинических проявлений, осложняют своевременную диагностику и дифференциацию его форм. В связи с чем, важная роль отводится лабораторным методам подтверждения диагноза (Абусуева, Арбулиева, Хаиров, 1999; Закарян, Цирельсон, Бекетов и др., 1999; Дентовская, Шарова, Самойлова и др., 2000; Baldi, Wanke, Loza et al., 1994; Baldi, Miguel, Fossati et al., 1996; Nunez-Torres., Diaz-Aparicio, Tenorio et al., 1998).

До 1995 года в практическом здравоохранении России использовались диагностические препараты, производимые в странах ближнего зарубежья (Украине, Республике Казахстан, Грузии, Молдове). В связи с возникшими зна-

БИБЛИОТЕКА

С.Петербург

09 3003 акт/65

чительными трудностями в поставках МИБП из указанных государств, а также отсутствием аналогичного производства в Российской Федерации, Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора Российской Федерации дал указание (от 28.04.1995 г. № 28) разработать и организовать выпуск МИБП для диагностики особо опасных инфекций и индикации их возбудителей в Российских научно-исследовательских противочумных институтах. На рабочем совещании представителей противочумных институтов, состоявшемся 16-18 мая, 1995 г., было принято решение о распределении номенклатуры МИБП между институтами. В частности, СтавНИПЧИ, в ряду прочих, было вменено в обязанность совершенствование, разработка бруцеллезных МИБП и организация их производства.

ЦЕЛЬ И ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Цель диссертационной работы заключалась в совершенствовании методов и разработке новых медицинских иммунобиологических препаратов для диагностики бруцеллеза и индикации его возбудителей.

Для достижения указанной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Разработать высокочувствительные и специфичные бруцеллезные антигенные эритроцитарные и суспензионный диагностикумы для выявления специфических антител.
2. Разработать композиционные сорбенты с магнитными свойствами для селективной иммуносорбции специфических антител и антигенов при диагностике бруцеллеза и индикации его возбудителей в экспрессных методах иммуноанализов (ИФА и КИФА).
3. Разработать условия сочетанных методов детекции возбудителя бруцеллеза: магноиммуносорбция – ПЦР - анализ; магноиммуносорбция – хемилюминесцентный иммунный анализ (ХЛИА).
4. Провести лабораторные и клинические испытания диагностикумов.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ. Разработаны высокочувствительные и специфичные антигенные эритроцитарные и латексный диагностикумы для серологической диагностики бруцеллеза.

Показана эффективность и ценность применения антигенных магноиммуносорбентов в экспресс-методах диагностики бруцеллеза.

Разработаны условия сочетанных методов предварительное селективное концентрирование инфекционного агента на магноиммуносорбенте с последующей его детекцией в ПЦР – анализе и индикация возбудителя бруцеллеза в хемилюминесцентном иммунном анализе с предварительным избирательным концентрированием на магноиммуносорбенте, что впервые дало возможность применения ХЛИА для исследования объектов внешней среды.

Приоритетность вышеизложенного подтверждена:

- Патентом РФ № 21 65081 РФ, С 2 7 G 01 № 33/ 53, заяв. 05.01.99., опубл. 10.04.2001, Бюл. № 10. "Способ индикации микроорганизмов";

-Положительным решением № 542 от 12.11.2001 г. на патент РФ: "Способ лабораторной диагностики бруцеллезной инфекции у людей";

-Положительным решением № 2001135978 от 05.03.2002 г. на патент РФ: "Способ обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды".

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ РАБОТЫ. Предварительное селективное концентрирование патогена на аффинном магносорбенте дает возможность с большей эффективностью исследовать объекты внешней среды, в том числе и сильно загрязненные, а последующая индикация возбудителей в таких методах как полимеразная цепная реакция и хемилюминесцентной иммунный анализ позволяет повысить эффективность и достоверность исследования при увеличении специфической чувствительности на 2-3 порядка по сравнению с общепринятыми экспрессными методами. Разработанные бруцеллезные антигенные магноиммуносорбентные тест-системы для избирательного концентрирования специфических антител и последующего проведения ИФА и КИФА обладают более высокой разрешающей способностью, что выражается в увеличении числа серопозитивных результатов исследований на бруцеллез по сравнению с традиционными лабораторными методами иммуноанализов. Проведенные лабораторные и клинические испытания разработанных бруцеллезных антигенных эритроцитарных и латексных диагностикумов свидетельствуют об их высокой чувствительности, специфичности и перспективе использования в лабораториях практического здравоохранения РФ.

Составлена нормативная документация на диагностикум эритроцитарный бруцеллезный антигенный сухой и жидкий (регламент производства, фармакопейная статья предприятия, инструкция по применению), одобренная Ученым Советом СтавНИПЧИ и утвержденная директором института (протокол № 11 от 28.10. 1998 г.).

Материалы исследований легли в основу: методических рекомендаций "Детекция бруцелл в материале, зараженном или подозрительном на зараженность возбудителем бруцеллеза, с помощью полимеразно-цепной реакции с предварительным селективным концентрированием на МИС", одобренных Ученым Советом СтавНИПЧИ и утвержденных директором института (протокол № 1 от 27.01.2000 г.); "Методических рекомендаций по применению антигенных бруцеллезных магноиммуносорбентов в методах иммуноанализа (непрямого ИФА и КИФА)", одобренных Ученым Советом СтавНИПЧИ и утвержденных директором института (протокол № 5 от 31. 05. 2001 г.); "Методических рекомендаций по использованию тест-системы бруцеллезной иммуноглобулиновой магноиммуносорбентной в хемилюминесцентном иммуноанализе (ХЛИА)", одобренных Ученым Советом СтавНИПЧИ и утвержденных директором института (протокол № 1 от 30.01. 2002 г.).

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Разработка антигенных бруцеллезных эритроцитарных (на основе белкового и липосахаридного сенситинов) и латексного диагностикумов для выявления специфических антител.
2. Получение МИБП на основе магноиммуносорбентов и использование их в экспресс-методах диагностики и индикации возбудителей бруцеллеза.
3. Результаты изучения диагностической ценности бруцеллезной антигенной магноиммуносорбентной тест-системы в методах непрямого иммуноанализа ИФА и КИФА, бруцеллезных антигенных эритроцитарных и суспензионных диагностикумов в лабораторных и клинических испытаниях при исследовании сывороток крови с целью обнаружения специфических антител.
4. Разработанные условия сочетанных методов: предварительное селективное концентрирование инфекционного агента на магноиммуносорбенте с последующей его детекцией в ПЦР – анализе и индикация возбудителей бруцеллеза в ХЛИА с предварительным избирательным концентрированием на магноиммуносорбенте.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ И ПУБЛИКАЦИИ. Основные результаты диссертационной работы были представлены и доложены на юбилейной научной конференции, посвящённой 70-летию НИИ микробиологии МОРФ 30 ноября-1 декабря, 1998 г. (Киров); научной конференции общества молодых ученых и специалистов Ставрополь (Ставрополь, 18 марта, 1999 г.); I Всесоюзного научно- практической конференции 21-22 ноября, 2000 г. (Саратов); международной научно-практической конференции "Современный эпидемиологический потенциал природных очагов чумы", посвященной 10-летию Суверенитета Республики Казахстан и 50-летию Талдыкарганской ПЧС 1-2 августа, 2001 г. (г. Талдыкарг); межлабораторной научной конференции Ставропольского НИПЧИ (3 октября, 2002 г.).

Основные результаты диссертации отражены в 13 научных публикациях.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего 202 отечественных и 160 зарубежных источников. Она изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы и 14 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При выполнении работы были использованы 16 штаммов микроорганизмов II, III и IV групп патогенности родов: *Brusella* - 6 штаммов, *Francisella* - 5 штаммов, *Yersinia* - 3 штамма, *Escherichia* - 2 штамма. Для выращивания микроорганизмов использовали соответствующие питательные среды.

Ультразвуковое разрушение микробных клеток проводили на установке УЗДН 2Т (Россия).

Водорастворимые бруцеллезные антигены изолировали водно-солевой экстракцией после ультразвукового разрушения микробных клеток (Афанасьев, 1984), липополисахариды выделяли водно-фенольной экстракцией по модифицированной методике Е. Могоно (1974). Определение оптической плотности суспензий проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2- УХЛ 4.2 при длине волны 540 нм. Количественное определение белка осуществляли спектрофотометрически по О. Warburg, W. Christian (1941).

Гипериммунные сыворотки получали при иммунизации кроликов породы "Шиншилла" по схеме, предложенной И.С.Тюменцевой (1996). Активность иммунных сывороток оценивали в реакции иммунной диффузии в агаровом геле по О.Оухтерлони (1949).

Иммуноглобулины из гипериммунных бруцеллезных сывороток выделяли по методу А. Polson et al. (1964) с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000).

Иммунопероксидазные конъюгаты получали по методу Р.К. Nakane, А. Kawaoi (1974) в модификации Е.А. Ткаченко (1982). Рабочий титр ИПК проверяли методом двойного антительного "сэндвича" по методике M.F. Clark, F.M. Adams, 1977. Результаты учитывали на регистрирующем спектрофотометре "Multiskan" (Флоу лаб.; Англия).

Получение флюоресцирующих иммуноглобулинов проводили по методу Х. Шторц (Stortz, 1987). Прямой метод окрашивания проводили по методике, предложенной А.Н. Coons, М.Н. Kaplan (1950). При проведении реакции непрямой иммунофлюоресценции использованы методики, рекомендованные Т.Н. Weller, А.Н. Coons (1954). Количественный иммунофлюоресцентный анализ (КИФА) проводили по методу К.Г. Стоева, В.А. Чибисовой, К.Л. Шаниной (1981).

Генетическую идентификацию возбудителей бруцеллеза осуществляли методом ПЦР-анализа с использованием амплификаторов Gene Amp PSR System 2400 "Perkin Elmer" и PCT Minicycler "M. J. Research" (США). Для детекции бруцелл использовали тест-систему "Ниармедик" (Россия), включающую праймеры 1 и 2, в соответствии с инструкцией изготовителя и "Методическими указаниями по детекции патогенной микрофлоры в клиническом материале, пищевых продуктах, объектах внешней среды и выполнению генетической идентификации клеток с помощью ПЦР" (ВНИПЧИ "Микроб").

Хемиллюминесцентный иммуноанализ (ХЛИА) проводили согласно методическим рекомендациям Волгоградского научно-исследовательского противочумного института совместно с МГУ им. М. В. Ломоносова, утвержденным в 1991 г. МЗ СССР.

Сублимацию иммуноглобулинов, антигенов, сывороток и конъюгатов проводили в камерах TG-5 (ГДР). Готовые препараты разливали в ампулы по 0,5 мл, замораживали в низкотемпературном столе LZ-280/75 при температуре минус $(45 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ не менее 19 часов. Высушивали в сушильной камере в вакууме. Лиофилизированные препараты хранили при температуре $4-6^{\circ}\text{C}$.

Кроме этого, при выполнении работы использовали следующее оборудование: термостат, рН-метр, лабораторные весы "Sartorius", сканирующее устройство "Мультискан", люминесцентный микроскоп "Люмам Р-8", микрофлюоресцентная приставка ФМЭЛ-1, источник постоянного тока - 5-24 А, электрометрический усилитель У-5-7 с фотометрической насадкой, хемиллюминометр, центрифуги ЦРЛ-1 и К-24.

В опытах использованы 15 кроликов породы "Шиншилла и 1 баран.

Экспериментальные данные были обработаны методами вариационной статистики, изложенными в работах И.П. Ашмарина, А.А. Воробьева (1962), В.Ю. Урбаха (1975), П.И. Сызранцева (1938).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработка антигенных препаратов для серологической диагностики бруцеллеза

До сих пор традиционно используются простые, достаточно чувствительные, не требующие применения специальной аппаратуры и поэтому общедоступные серологические тесты и, в частности, РНГА. Причем, подходы к их изготовлению отличаются большим разнообразием с различным конечным результатом. При отработке биотехнологии изготовления эритроцитарного антигенного бруцеллезного диагностикума необходимо было решить ряд задач: выбрать специфичный лиганд и подобрать эффективную методику его извлечения из микробной клетки; отработать условия формализации эритроцитов барана; подобрать условия сенсibilизации эритроцитов специфичным бруцеллезным антигеном; отработать условия его стабилизации. Комплексный водорастворимый белковый антиген изолировали водно-солевой экстракцией в сочетании с ультразвуковой дезинтеграцией, используя биомассы вакцинных штаммов *V.abortus* 19, *V.suis* 6, *V.melitensis* Rev-1 (рисунок 1). Кроме водорастворимых комплексов бруцелл, в качестве сенситина использовали специфический ЛПС, извлеченный из микробных клеток S-форм бруцелл водно-фенольной экстракцией по модифицированному методу E.Moreno et al. (1974). Антигены иммобилизовали на поверхности эритроцитов барана, формализированных по методу Чизмена в модификации М.И. Леви с соавт. (1962), при этом активацию их поверхности проводили 2%

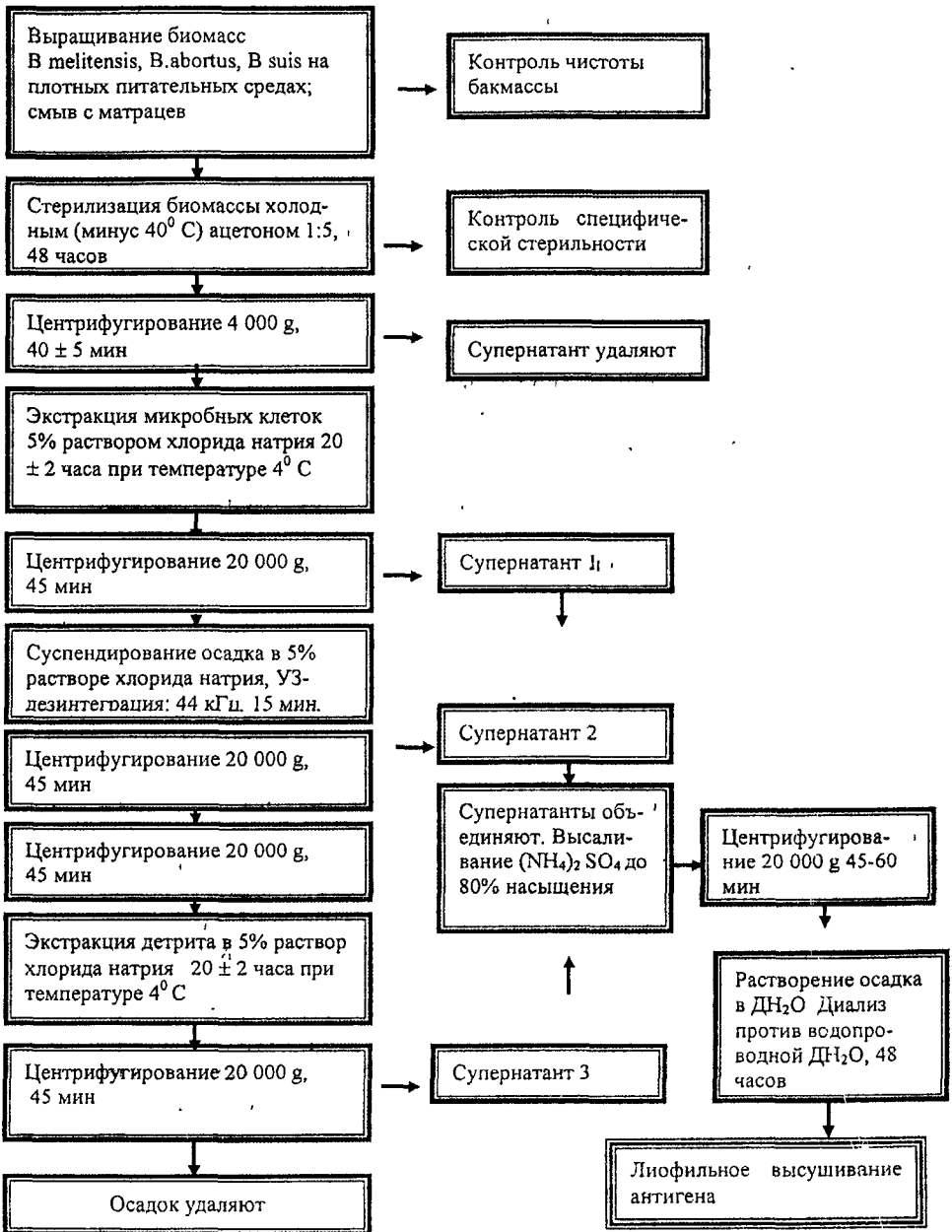


Рисунок 1. Схема получения комплексного водорастворимого бруцеллезного антигена

раствором вторичного алкилсульфата натрия. Оптимальная нагрузка белкового лиганда равнялась 200 мкг/мл, а ЛПС – 100 мкг/мл при следующих условиях конъюгации: концентрация эритроцитов 20%; температура их связывания с сенситином 45⁰ С; рН раствора – 6,0 в течение 18 часов. Для длительного сохранения исходных свойств и увеличения срока годности отработаны режимы лиофильного высушивания бруцеллезных эритроцитарных антигенных диагностикумов. При контроле полученных серий диагностикумов титры специфических антител в РНГА достигали 1: 10 240-1: 20 480 при нагрузке водорастворимым белковым лигандом, а при сенсibiliзации ЛПС – не менее 1: 20 480. При изучении специфичности на коммерческих гетерологичных агглютинирующих сыворотках перекрестных реакций не наблюдалось.

Таким образом, антигенные эритроцитарные препараты с обоими сенситинами пригодны для лабораторной диагностики бруцеллеза. На диагностикумы составлена нормативная документация (регламент производства, фармакопейная статья предприятия, инструкция по применению), утвержденная директором и одобренная Ученым Советом СтавНИПЧИ (протокол № 11 от 28.10.1998 г.). ОБТК проведены лабораторные испытания экспериментальных серий препаратов, которые подтвердили соответствие их требованиям нормативной документации и общим медико-биологическим требованиям, предъявляемым к эритроцитарным диагностикумам. Диагностическая ценность диагностикумов подтверждена клиническими испытаниями при исследовании сывороток крови женщин из роддома г. Ставрополя (акт испытаний от 20.12.2000 г.). В таблице 1 представлены сравнительные данные количества положительно реагирующих сывороток в РНГА и традиционной реакции агглютинации (Райта), свидетельствующие о более высокой чувствительности полученного нами диагностикума.

Латексные микроносители обеспечивают более воспроизводимые результаты по сравнению с эритроцитарными и могут с успехом их заменять в реакции геммагглютинации в связи с тем, что химические свойства полимерных микросфер относительно постоянны и поддаются более легкой и точной характеристике по сравнению с поверхностными свойствами наружной мембраны эритроцитов (Лукин, 1986; Воробьева, Фокина, 1992; Matsumoto, Ishikawa et al., 1993; Young, Moyesctal, 1998).

Для изготовления суспензионного бруцеллезного антигенного диагностикума нами разработана биотехнологическая схема, включающая выделение комплексного белкового водорастворимого антигена, получение окрашенной полиакролеиновой матрицы, иммобилизацию антигена на поверхности латекса, лиофилизацию диагностикума (рисунок 2).

Изучение чувствительности и специфичности 15 экспериментально-производственных серий диагностикума при постановке РАЛ на стекле (качественный тест) и титровании 1326 сывороток крови от людей в

**Таблица 1. Сравнительные данные количества положительно реагирующих сывороток
в РНГА и реакции Райта**

№ п/п	Контингент обследованных женщин	Число обследованных женщин		Положительно реагирующие на бруцеллез сыворотки кров			
				Первичные исследования		Повторные исследования	
		N	%	N	%	N	%
	Всего обследовано, из них:	1326		14	1,05	14	1,05
1.	Здоровые беременные	714	53	-	-	-	-
2.	Роженицы	216	16,3	-	-	-	-
3.	Ранние выкидыши	66	16,6	3	0,23	3	0,23
4.	Поздние выкидыши	30	7,6	3	0,23	3	0,23
5.	Замершая беременность	31	7,8	1	0,075	1	0,075
6.	Уродство плода	7	1,7	1	0,075	1	0,075
7.	Преждевременные роды	27	6,8	2	0,15	2	0,15
8.	Многоводие	73	18,5	-	-	-	-
9.	Преждевременная отслойка плаценты	11	2,8	2	0,15	2	0,15
10.	Хроническая внутриутробная гипоксия плода (ХВГП)	151	38,2	2	0,15	2	0,15



Рисунок 2. Принципиальная технологическая схема изготовления суспензионного бруцеллезного диагностикума для РАЛ

микропланшетах (количественный тест) свидетельствовало о равноценности эритроцитарному антигенному бруцеллезному диагностикуму и возможности применения в практическом здравоохранении, особенно при проведении массовых обследований на бруцеллез.

2. Получение аффинных сорбентов с магнитными свойствами для диагностики бруцеллеза в экспрессных методах иммуноанализа (ИФА и КИФА)

Новые возможности в диагностике инфекционных заболеваний вносят иммуносорбционные методы, особое место среди которых занимают аффинные сорбенты с магнитными свойствами. Используя принцип получения биотехнологических композиционных МИС на основе алумосиликата, мы изготовили бруцеллезные антигенные композиционные магнимоносорбенты на основе кремнезема-алюмосиликата (КМИС).

Технология получения магнимоносорбента на основе алюмосиликата включает 8 стадий. На I стадии получали гидрогель из алюмосиликата $Al_2O_3 \times 3SiO_2 \times nH_2O$ и компонентов синтеза (Fe_2O_3 , полиглюкин); на II стадии происходило созревание композиционного гидрогеля; на III стадии путем термообработки из гидрогеля получали ксерогель; на IV стадии производили размельчение ксерогеля механическим путем; на V стадии получали методом рассева высокодисперсные фракции сорбента; на VI – проводили химическое модифицирование сорбента активными группами (метод окисления с помощью вторичного алкилсульфата натрия); на VII стадии - ковалентное присоединение лиганда (бруцеллезный комплексный водорастворимый антиген); VIII стадия- лиофилизация (рисунок 3).

В итоге был получен магнимоносорбент, представляющий собой высокодисперсные микрогранулы размером от 70 до 150 мкм, неправильной формы, обладающие магнитными свойствами, хорошей смачиваемостью, отсутствием склонности к агрегации, с повышенной специфической емкостью, характеризующийся механической, химической и микробиологической устойчивостью, а также способностью к лиофилизации с сохранением при этом специфической биологической активности.

Изготовлено 18 экспериментальных серий алюмосиликатных бруцеллезных антигенных магнимоносорбентов, которые были проверены на активность и специфичность в методах иммуноанализов: непосредственно иммуноферментном и количественном иммунофлюоресцентном.

Диагностическая ценность разработанного антигенного композиционного МИС была подтверждена при исследовании 1326 сывороток беременных женщин, поступивших в палату патологии, на роды, у здоровых беременных и с отягощенным акушерским анамнезом (самопроизвольными выкидышами на ранних и поздних сроках, с замершей беременностью, уродством плода, преждевременными родами, многоводием, преждевременной отслойкой нормально расположенной плаценты, хронической внутриутробной гипоксией

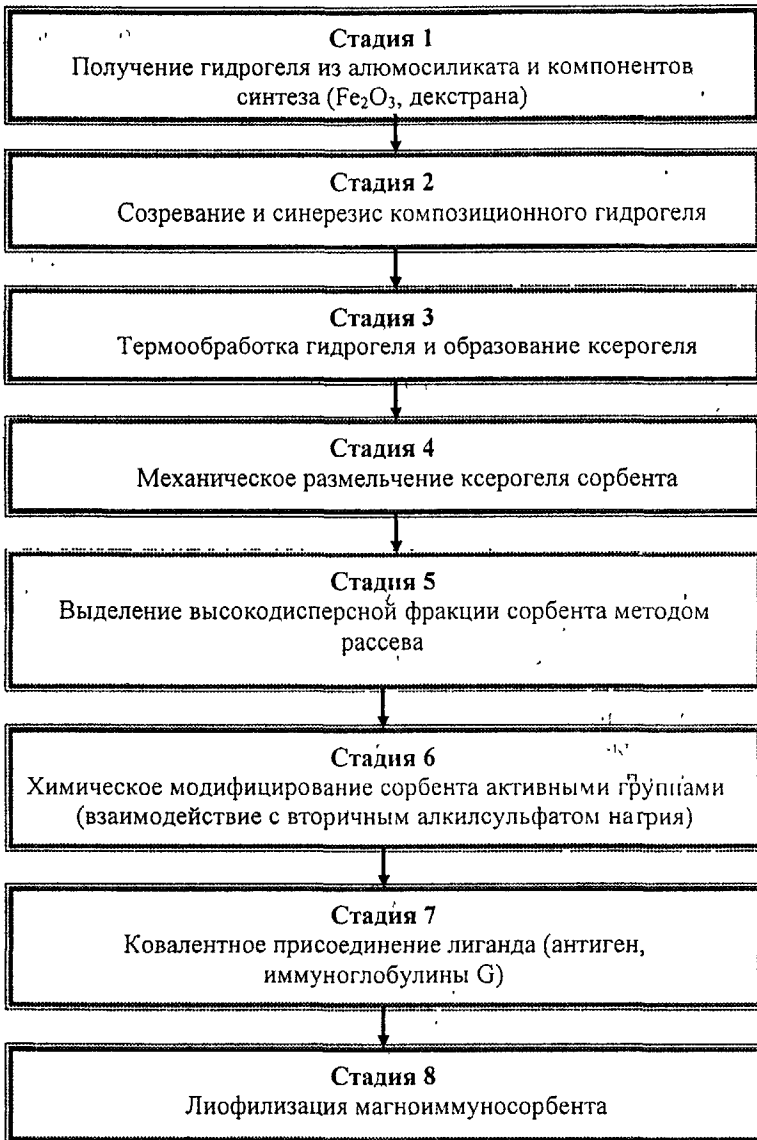


Рисунок 3. Схема получения алюмосиликатного магнoиммуносорбента

плода) на базе клинической лаборатории Ставропольского родильного дома.

Параллельно эти же сыворотки исследовали в непрямом ИФА и НРИФ без применения КМИС.

При исследовании сывороток крови показано преимущество использования композиционных антигенных КМИС в ИФА, которое выразилось в увеличении положительных результатов на 0,22 % от общего количества исследованных сывороток и на 21,5 % от общего количества положительно реагирующих сывороток (при разведении сывороток 1:200) при сравнении с результатами исследования этих же сывороток в непрямом ИФА без использования КМИС.

Исследование эффективности и чувствительности разработанных КМИС в КИФА показало преимущество данного теста на 0,23% от общего количества исследованных сывороток и на 14, 3% от общего количества положительно реагирующих сывороток (в разведении 1:200) по сравнению с НРИФ.

Таким образом, при использовании антигенных бруцеллезных магнимоносорбентных тест-систем дополнительно были выявлены 14 женщин с положительными реакциями на бруцеллез. В последующем у них выявлена положительная аллергическая реакция и при детальном клиническом обследовании поставлен диагноз: "бруцеллез".

Были проведены повторные исследования положительно реагирующих сывороток крови, взятых спустя 2 недели после первого исследования в этих же методах. При этом отмечено подтверждение ранее полученных результатов без нарастания титров антител, что свидетельствовало об отсутствии динамики процесса.

В результате исследований отмечено, что при помощи методов иммуноанализов - непрямого ИФА и количественного иммунофлюоресцентного анализа (КИФА) с использованием бруцеллезного антигенного КМИС выявлены положительные сыворотки крови с более высокими титрами специфических антител, чем в традиционных методах иммуноанализа (непрямого ИФА и НРИФ).

Проведенные исследования свидетельствуют о более высокой разрешающей способности методов иммуноанализов с применением КМИС, что выражается в повышении их чувствительности и информативности, а также перспективности использования в диагностике бруцеллезной инфекции. На основе полученных результатов оформлены методические рекомендации: "Использование бруцеллезных антигенных МИС тест-систем в методах иммуноанализа непрямым ИФА и КИФА", утвержденные директором и одобренные Ученым Советом СтавНИПЧИ (протокол № 5 от 21.05.01.).

3. Разработка сочетанных методов индикации возбудителей бруцеллеза: магнимоносорбция – полимеразная цепная реакция и магнимоносорбция – хемилюминесцентный анализ

Способность магнимоносорбентов прочно (на уровне реакций антиген-антитело) фиксировать на своей поверхности искомый антиген дает возможности исследовать широкий диапазон проб, в том числе и сильно загрязненных, и их объемов (от нескольких сот микролитров до многих кубических метров жидкостей), осуществлять тщательную отмывку пробы от загрязнений, мешающих проведению индикационных реакций, тем самым, повышая достоверность как положительных, так и отрицательных результатов.

Для дальнейшего совершенствования экспрессных методов индикации возбудителей бруцеллеза мы объединили метод предварительного концентрирования искомого патогена на КМИС с последующей детекцией его в полимеразной цепной реакции и хемилюминесцентном анализе.

В основе ПЦР лежит амплификация участка генома путем многократного копирования специфической для данного микроорганизма нуклеотидной последовательности с последующей визуализацией фрагментов ДНК в электрофореze.

Хемилюминесцентная реакция является разновидностью люминесценции. Хемилюминесцентными называют химические реакции, при которых вещества переходят в возбужденное состояние, а затем высвобождают накопленную энергию в виде эмиссии света. Применительно к микробиологическим исследованиям один из компонентов специфической реакции "антиген-антитело" конъюгируют (метят) маркером, участвующим в последующем в реакции хемилюминесценции, которую регистрируют любыми приборами, чувствительными к эмиссии видимого света, используя для этого сцинтилляционные счетчики или люминометры.

При отработке условий сочетанного метода: КМИС + ПЦР эксперименты проводили с чистыми культурами бруцеллезного микроба *B. abortus* 19 и в модельных опытах на почве и фураже, контаминированных возбудителем *B. abortus* 544. Из культуры *B. abortus* 19, выращенной при температуре 37° С, готовили по 500 мл суспензий с концентрациями 1×10^1 ; 1×10^2 ; 2×10^2 ; 5×10^2 ; 8×10^2 ; 1×10^3 мк. кл., в которые вносили по 1 мл взвеси клеток гетерологичных штаммов (*Fr.tularensis*, *Y.enterocolitica*, *E.coli*) в концентрации 1×10^9 мк.кл./мл. Пробой пропускали самотеком через специальную проточную магнитную ловушку с фиксированным бруцеллезным КМИС. После контакта с пробой и тщательной отмывки физиологическим раствором для лизиса клеток и их стерилизации имносорбент прогревали на водяной бане при температуре 100° С в течение 30 мин. Аликвоту в 5 мкл исследовали в ПЦР, используя тест- систему "Ниармедик" (Россия), включающую праймеры 1 и 2. Амплификацию осуществляли с использованием амплификаторов Gene Amp

PSR System 2400 фирмы "Perkin Elmer" и PCT Minicycler "M.J. Research" (США).

В качестве положительных контролей были использованы образцы ДНК возбудителя бруцеллеза.

Параллельно исследуемые пробы подвергали ПЦР - анализу без предварительного концентрирования на МИС с использованием вышеуказанной тест-системы.

Положительные результаты получены при обоих вариантах постановки, однако в ПЦР без КМИС этот показатель составил $- 2 \times 10^2$ мк.кл./мл, а при постановке ПЦР с КМИС $- 1 \times 10^2$ мк.кл. в объеме пробы, что повысило чувствительность анализа на несколько порядков.

В модельных опытах на почве и фураже, загрязненных вирулентным штаммом *B.abortus 544* в концентрациях 1×10^1 ; 1×10^2 ; 2×10^2 ; 5×10^2 ; 8×10^2 ; 1×10^3 мк. кл. в объеме пробы, после концентрирования на КМИС и проведения ПЦР-анализа получены идентичные результаты.

При подборе условий сочетанного метода: КМИС+ХЛИА были использованы бруцеллезные магнимоносорбенты, выявляющие возбудитель бруцеллеза в S-форме, соответствующие бруцеллезные иммунопероксидазные конъюгаты в разведении 1:200, бруцеллезные корпускулярные антигены *Br.abortus 544*, *Br.melitensis 16-M*, *Br.suis 1330* в разведениях $1 \times 10^9 - 1 \times 10^1$ мк/мл, водорастворимые антигены *Br.abortus 544*, *Br.melitensis 16-M*, *Br.suis 1330* в разведениях 0,05 – 20 нг/мл, а так же корпускулярные антигены гетерологичных штаммов *Fr.tularensis Schu*, *Y.enterocolitica 383*, *E.coli 010* в концентрации 1×10^9 мк/мл. Опыты проводили как на чистых культурах, так и загрязненных пробах почвы и фуража, как описано выше. Чувствительность бруцеллезных КМИС, выявляющих возбудитель бруцеллеза в ХЛИА, составил $1 \times 10^2 - 1 \times 10^1$ мк.кл. в пробе для корпускулярных антигенов и 0,1 нг/мл – для водорастворимых, при этом воспроизводимость опытов была 100 %.

Таким образом, проведенные эксперименты по сочетанному применению предварительного концентрирования возбудителей бруцеллеза на аффинных сорбентах с магнитными свойствами и последующей детекцией патогена в ПЦР-анализе и ХЛИА убедительно показали возможность обнаружения от 10 до 100 мк.кл. и выше в исследуемом объеме пробы, в том числе и сильно загрязненной, что свидетельствует о значительном (на несколько порядков) повышении чувствительности названных методов. При этом нами впервые ХЛИА был успешно привлечен для исследования объектов внешней среды.

Новизна проведенных разработок и полученных положительных результатов подтверждены патентами: "Способ индикации микроорганизмов". Патент РФ № 21 65081 РФ, С 2 7 G 01 № 33/ 53, заяв. 05.01.99., опубл. 10.04.2001, Бюл. № 10; "Способ лабораторной диагностики бруцеллезной инфекции у людей" (положительное решение на заявку № 2001121392/14 от 12.10.01 г.);

"Способ обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды" (положительное решение на заявку № 2001135978 от 05.03.02 г.). Составлены методические рекомендации по детекции бруцелл в материале, зараженном или подозрительном на зараженность возбудителем бруцеллеза, с помощью полимеразной цепной реакции с предварительным селективным концентрированием на МИС, утвержденные директором и одобренные Ученым Советом СтавНИПЧИ (протокол № 1 от 27.01.2000 г.); "Использование тест-системы бруцеллезной иммуноглобулиновой магноиммуносорбентной в хемилюминесцентном иммуноанализе", утвержденные директором и одобренные Ученым Советом СтавНИПЧИ (протокол № 1 от 30.01.02).

ВЫВОДЫ:

1. Разработан оптимальный вариант биотехнологии получения бруцеллезных эритроцитарных антигенных диагностикумов на основе комплексного водорастворимого белкового антигена и специфического липополисахарида, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью.

2. На основе комплексного водорастворимого белкового бруцеллезного антигена и полиакролеиновой матрицы сконструирован суспензионный лиофилизированный диагностикум для выявления специфических антител.

3. Впервые сконструирована магноиммуносорбентная антигенная тест-система для диагностики бруцеллеза в экспрессных методах иммуноферментного анализа и непрямом методе количественной иммунофлюоресценции.

4. Показана возможность и подобраны условия сочетанного применения избирательного концентрирования возбудителей бруцеллеза на магноиммуносорбенте с последующей постановкой ПЦР-анализа, что позволило повысить чувствительность метода не менее чем в 1000 раз и сократить время проведения анализа до 3-х часов.

5. Впервые отработаны условия сочетанного применения предварительного селективного концентрирования возбудителей бруцеллеза на магноиммуносорбенте с последующим проведением хемилюминесцентного анализа, что позволило привлекать ХЛИА для исследования объектов внешней среды, при этом разрешающая способность метода составляет от 10 до 100 и выше мк.кл. в пробе.

6. Лабораторные и клинические испытания полученных бруцеллезных диагностикумов подтвердили их высокую чувствительность, специфичность, информативность, что расширяет возможности и арсенал лабораторных средств диагностики бруцеллеза и индикации его возбудителей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Касторная М.Н. Увеличение срока годности сенсibilизированных планшет //Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология Ветеринария: Материалы юбилейной Научной конференции, посвященной 70-летию НИИ микробиологии МОРФ (30 ноября-1 декабря, 1998). – С. 94-95.
2. Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Касторная М.Н. К вопросу диагностики возбудителя бруцеллеза //Эрдэм шинжилгээний бүтээл. – Улаанбаатар, 1999. - N 7. – С. 229-231.
3. Соколова И.А., Лямкин Г.И., Касторная М.Н. Современные генетические методы исследования бактерий рода бруцелла //Диагностика и профилактика ОО и др. инфекций. Материалы научной конференции общества молодых ученых и специалистов СтавНИПЧИ. – Ставрополь, 18 марта, 1999 г. – СтавНИПЧИ. – Ставрополь, 1999. – С. 47-54. – Деп. в ВИНТИ 28. 01. 00. УДК 579. 841.93.-024:579.25.
4. Соколова И.А., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Касторная М.Н. Способ индикации бруцелл, основанный на применении ПЦР //Генная диагностика ООИ: Мат. I Всесоюзного научно- практической конф. (21-22 ноября, 2000 г., Саратов). – Саратов, 2000. – С. 40-41.
5. Сравнительное изучение методов подготовки проб материала, содержащего бруцеллы, к проведению ПЦР-анализа (Соколова И.А., Лямкин Г.И., Брюханов А.Ф., Ляпустина Л.В., Малецкая О.В.). - //Проблемы особо опасных инфекций: Сборник научных трудов. – Вып. 80. – Саратов, 2000. – С. 148-151.
6. Касторная М.Н., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С. Бруцеллез. Лабораторная диагностика (Обзор литературы). - Деп. в ВИНТИ 21.08.00. № 2887-ВОО.
7. Афанасьев Е.И., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Жарникова И.В., Жданова Е.В., Еременко Е.И., Касторная М.Н., Маркова Т.И., Сергеев Д.В. Совершенствование экспресс-методов индикации возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний - Ставрополь, 2000. – 11 с. – Деп. в ВИНТИ 14.02.2000, № 362-В00.
8. Касторная М.Н., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Жарникова И.В., Жданова Е.В. Хемилюминесцентный иммуноанализ в лабораторной диагностике бруцеллеза с использованием МИС //Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане: Матер. междунард. научно-практич. конференции " Современный эпидемиологический потенциал природных очагов чумы", посвящ. 10-летию Суверенитета Республики Казахстан и 50-летию Талдыкорганской ПЧС (г. Талдыкарг 1-2 августа, 2001 г.). – Вып.3. – Алматы, 2001. – С. 116-119.

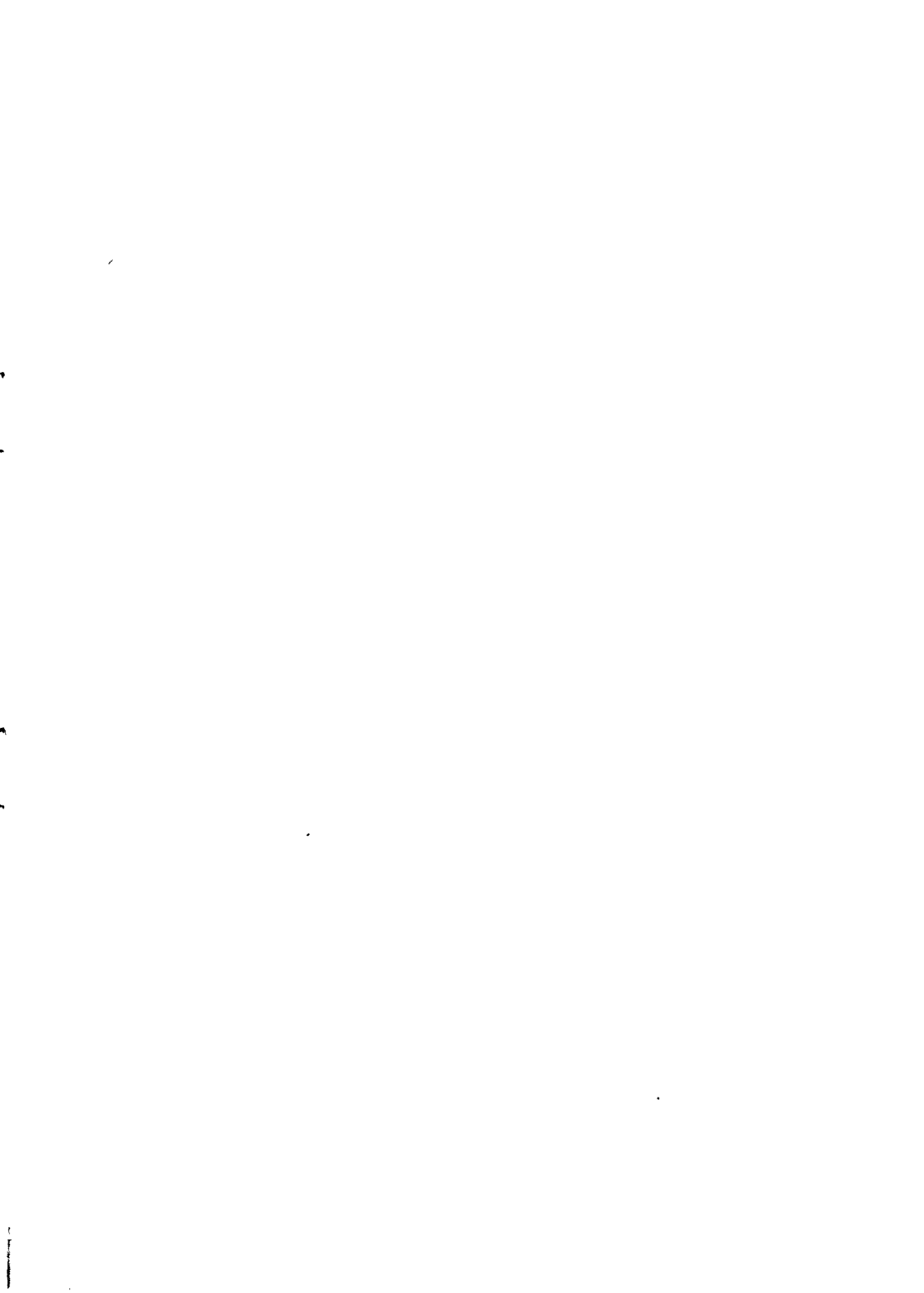
9. Ефременко В.И., Тюменцева И.С., Жилченко Е.Б., Маркова Т.В., Соколова И.А., Абгарян А.Г., Касторная М.Н., Урусбанбетов З.Х., Мезенцева О.Н., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф., Афанасьев Е.Н., Сон Джи Джоу. Способ индикации микроорганизмов //Патент № 2165081 РФ, С 2 7 G 01 № 33/ 53, заяв. 05.01.99., опубл. 10.04.2001, Бюл. № 10.

10. Соколова И.А., Лямкин Г.И., Ляпустина Л.В., Малецкая О.В., Тамбовцев А.В., Касторная М.Н. Способ лабораторной диагностики бруцеллезной инфекции у людей //Решение о выдаче патента на заявку № 2001121392/14 от 20 ноября 2002 г.

11. Ефременко В.И., Тюменцева И.С., Касторная М.Н., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В., Жданова Е.В. Способ обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды //Уведомление о положительном решении формальной экспертизы № 2001135978 от 5.03.2002 г.

12. Касторная М.Н., Жданова Е.В., Жарникова И.В., Зайцев А.А. Разработка латексного антигенного диагностикума для обнаружения специфических бруцеллёзных антител //Материалы юбилейной научно-практической конференции "Эпидемиологическая безопасность. Итоги и перспективы", посвящённой 50-летию СтавНИПЧИ. (15-16 октября 2002 г). - С.118-120.

13. Жданова Е.В., Касторная М.Н., Тюменцева И.С. Конструирование эритроцитарного бруцеллезного антигенного диагностикума //Материалы юбилейной научно-практической конференции "Эпидемиологическая безопасность. Итоги и перспективы", посвящённой 50-летию СтавНИПЧИ. (15-16 октября 2002 г). - С. 104-105.



Касторная Маргарита Николаевна

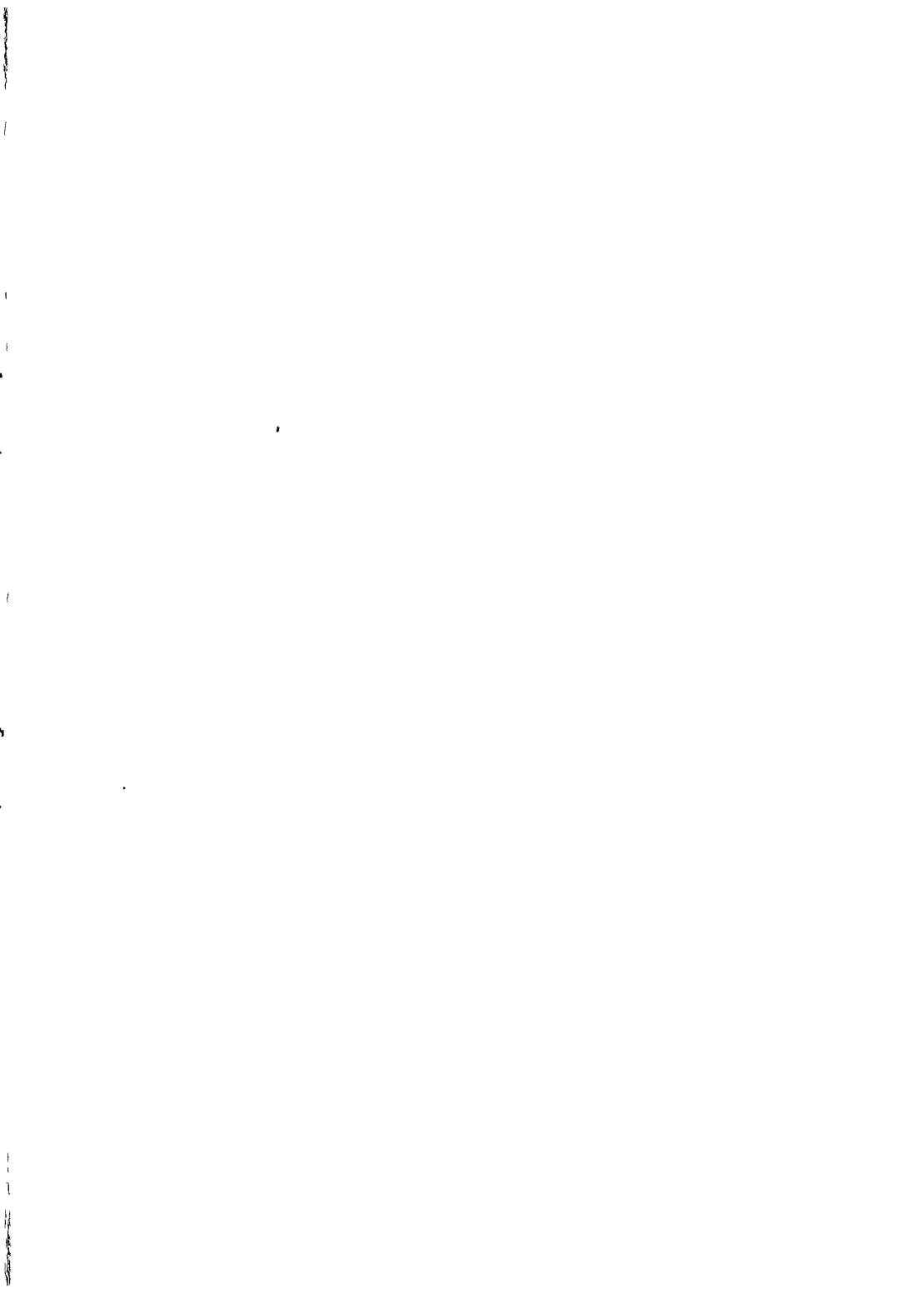
АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ЛР № 020326 от 20 января 1997 г.

Сдано в набор 29.04.03. Подписано в печать 29.04.03. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$
Бумага типогр. № 2. Печать офсетная. Гарнитура офсетная. Усл. печ. 1,3.
Уч.-изд. л. 1,5. Заказ 1668. Тираж 100 экз.

**Ставропольская государственная медицинская академия,
355024, г. Ставрополь, ул. Мира, 310.**



2003-A

11623

№ 11623