

МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.841.95]-078

Горбатов А.А.¹, Соловьёв П.В.¹, Баранова Е.В.¹, Титарёва Г.М.¹, Куликалова Е.С.², Бикетов С.Ф.¹, Мазепа А.В.²

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И КОММЕРЧЕСКИХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНЫХ АНТИТЕЛ У ЛЮДЕЙ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, пос. Оболенск, Московская обл., Серпуховский р-н, Российская Федерация;

²ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока 664047, Иркутск, Российская Федерация

Разработаны экспериментальные серологические тесты для определения противотуляремиальных антител у людей в форматах иммунохроматографии (ИХ-тест ЛПС Ft15) и иммуноферментного анализа (ИФА ЛПС Ft15) с использованием в качестве антигена высокоочищенного ЛПС F. tularensis 15 НИИЭГ. Проведён анализ чувствительности и специфичности разработанных тестов и коммерческого туляремиального антигена РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института) в сравнении с коммерческим референс-антигеном, зарегистрированным в РФ для количественного определения туляремиальных IgG человека – ELISA classic Francisella tularensis IgG SERION, Германия (ELISA IgG SERION). Исследование проб сывороток крови людей, вакцинированных против туляремии, показало, что чувствительность и специфичность детекции противотуляремиальных антител с помощью ИФА ЛПС Ft15 при сравнении с ELISA IgG SERION составили 97,7 и 100%. При определении противотуляремиальных антител с помощью ИХ-теста ЛПС Ft15 данные параметры составили по сравнению с ELISA IgG SERION 94,3 и 100%. Чувствительность и специфичность РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ составили по сравнению с ELISA IgG, SERION 59,1 и 80%.

Ключевые слова: туляремия; Francisella tularensis; серодиагностика; ЛПС; ИФА; иммунохроматография.

Для цитирования: Горбатов А. А., Соловьёв П. В., Баранова Е. В., Титарёва Г. М., Куликалова Е. С., Бикетов С. Ф., Мазепа А. В. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремиальных антител у людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (10): 630-635. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635>

Gorbatov A.A.¹, Soloviev P.V.¹, Baranova E.V.¹, Titareva G.M.¹, Kulikalova E.S.², Biketov S.F.¹, Mazepa A.V.²

A COMPARATIVE STUDY OF EXPERIMENTAL AND COMMERCIAL SEROLOGICAL TESTS FOR DETECTION OF ANTIBODIES IN HUMANS WITH TULAREMIA

¹142279, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation; ²Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, 664047, Irkutsk, Russian Federation

Experimental serological tests were developed to determine anti-tularensis antibodies in humans in immunochromatography formats (LF-test LPS Ft15) and enzyme immunoassay (ELISA LPS Ft15) using as an antigen highly purified LPS F. tularensis 15 NIEG. Analysis was conducted of the sensitivity and specificity of the developed tests and commercial tularemia antigen «RNGA-Tul-AG» (production Stavropol research anti-plague Institute) in comparison with the commercial reference antigen, registered in the Russian Federation for the quantitative determination of human IgG tularemia – «ELISA classic Francisella tularensis IgG» SERION, Germany (IgG SERION ELISA). A study of human blood serum vaccinated against tularemia showed that the sensitivity and specificity of detection of anti-tularensis antibodies by «ELISA LPS Ft15» were 97.7 and 100%, compared with «ELISA IgG series». When determining anti-tularensis antibodies with the diagnosis «LF-test LPS Ft15», these parameters were compared to «ELISA IgG series» 94.3 and 100%. The sensitivity and specificity of «RNGA-Tul-AG» made compared to the «IgG ELISA, SERION» of 59.1% and 80%.

Key words: tularemia; Francisella tularensis; serodiagnosis; LPS; ELISA; immunochromatography.

For citation: Gorbatov A. A., Soloviev P. V., Baranova E. V., Titareva G. M., Kulikalova E. S., Biketov S. F., Mazepa A. V. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (10): 630-635 (in Russ.) .DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635>

For correspondence: Gorbatov A.A., Junior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms; e-mail: gorbatov1986@mail.ru

Information about authors:

Gorbatov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-0799-893X>
Baranova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Soloviev P.V., <http://orcid.org/0000-0001-7355-8396>
Titareva G.M., <https://orcid.org/0000-0001-9478-5563>

Для корреспонденции: Горбатов Алексей Александрович, мл. науч. сотр. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: gorbatov1986@mail.ru

Kulikova E.S., <https://orcid.org/0000-0001-7034-5125>
Mazepa A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0843-4757>

Biketov S.F., <http://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.07.2018
Accepted 10.10.2018

Введение. Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, вызываемая грамотрицательной коккобациллой *Francisella tularensis*. Высокая восприимчивость для человека и значительная летальность (26,8%) [1] при отсутствии мер противодействия являются причиной отнесения туляремии к особо опасным инфекциям и потенциальным рецептурам для биологического оружия [2–4]. Распространённость переносчиков (мышей) в лесных и лесостепных ландшафтах, доминирующих на территории РФ, обусловила существование ряда природных очагов туляремии, в которых, несмотря на вакцинопрофилактику, ежегодно отмечаются спорадические и эпидемические случаи заболевания среди населения (МУ 3.1.2007-05 Эпидемиологический надзор за туляремией). В последней крупной вспышке в Ханты-Мансийском автономном округе зарегистрировано более 1000 случаев заболеваний человека преимущественно в язвенно-некротической форме [5, 6]. При расследовании вспышки использованы такие методы лабораторной диагностики туляремии, как аллергические пробы с тулярином и серологические тесты в формате РНГА [7], что указывает на недостаточную обеспеченность практического здравоохранения средствами диагностики туляремии. Подтверждение диагноза туляремии может быть получено путём выделения чистой культуры из клинических образцов, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), при помощи серологических реакций, показывающих наличие специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках пациентов [8, 9]. Выделение чистой культуры из крови пациентов с бактериемией даёт положительный результат не более чем у 10% пациентов [10]. Зачастую это связано с тем, что клинические образцы получают уже после проведения антибактериальной терапии. Результаты ПЦР-анализа могут быть использованы для подтверждения диагноза туляремии в случае обнаружения ДНК возбудителя в отделяемом кожных язв и в конъюнктивальных или глоточных экссудатах [8, 9]. Отсутствие специализированных ПЦР-лабораторий, имеющих разрешение на проведение работ с бактериальными агентами I–II групп биологической опасности, к которым относится данный возбудитель [11], сложность выделения чистой культуры туляремийного микроба, приводит к тому, что постановка диагноза туляремии чаще всего основывается на результатах серологических анализов. Всё это делает актуальным для диагностики туляремии совершенствование методов выявления антитуляремийных антител в крови у людей и животных, применимых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряжённости поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах. В действующих МУ «Эпидемиологический надзор за туляремией» 2011 г. предписывается использовать целый ряд серологических тестов на антитуляремийные антитела: реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), реакцию агглютинации (РА), метод флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментный анализ

(ИФА), реакцию нейтрализации антител (РНAt) (МУ 3.1.2007-05 Эпидемиологический надзор за туляремией) [12], однако в РФ для определения антитуляремийных антител доступен только один зарегистрированный коммерческий туляремийный диагностикум – РНГА-Тул-Аг-СтавНИИПЧИ (производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института). РНГА является простой в применении и подходит для исследования клинических образцов, полученных от человека и животных, для постановки данной реакции требуется от 6 до 24 ч; по некоторым данным литературы она недостаточно чувствительна [13, 14]. РНГА недостаточно специфична и может давать ложноположительные результаты при исследовании сывороток переболевших или больных некоторыми другими инфекциями, в частности бруцеллёзом [15, 16].

Наиболее распространёнными форматами серологических тестов в мире являются иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХ). Проведение ИФА требует оборудования, квалифицированного персонала и занимает не менее 3–6 ч, но даёт возможность количественной оценки и обеспечивает высокую аналитическую чувствительность. ИХ подходит для быстрой оценки наличия иммунитета (положительная реакция при титре сыворотки от 1:400) и может применяться в условиях плохо оснащённой лаборатории, фельдшерского пункта, у постели больного, в полевых условиях при работе в природных очагах туляремии. Результаты работ указывают на эффективность применения ИФА и ИХ для детекции специфических антитуляремийных антител в сыворотках крови человека [13, 17–20]. В большинстве из указанных работ для детекции антител использованы экспериментальные серии тестов и лишь в двух – коммерческие тесты: ИФА тест-система – ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (SERION, Германия) и ИХ тест-система – VIRapids (Santa Fé, Испания) [17, 18]. В РФ к началу 2018 г. коммерческие туляремийные серологические диагностикумы в форматах ИФА или ИХ не производятся, что делает весьма актуальными задачи по их разработке.

Поскольку при туляремии антительный иммунный ответ в основном направлен на иммунодоминантные эпитопы липополисахарида *F. tularensis* (ЛПС) [21, 22], использование стандартного очищенного туляремийного ЛПС в ИФА-диагностикумах и ИХ-тестах позволило достичь высоких показателей их чувствительности, специфичности, воспроизводимости [13, 23].

Цель исследования – разработка отечественных туляремийных серологических диагностикумов в форматах ИХ (ИХ-тест ЛПС Ft15) и ИФА (ИФА ЛПС Ft15) с использованием в качестве антигена высокоочищенного ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ (ЛПС Ft15). В качестве референс-диагностикума использован зарегистрированный в РФ коммерческий ИФА-диагностикум для количественного определения туляремийных IgG человека – ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (SERION, Германия).

Материал и методы. Образцы сывороток. Условно положительные сыворотки (от людей, вакцинированных против туляремии) в количестве 94 образцов ($n = 94$) предоставлены сотрудниками противочумной станции (ПЧС) г. Горно-Алтайск (Республика Алтай). Данные сыворотки получены от людей, год назад вакцинированных живой туляремийной вакциной. В качестве отрицательных контролей использовали сыворотки от здоровых людей в количестве 15 образцов ($n = 15$).

Получение препарата ЛПС. Выделение ЛПС проводили методом экстракции по Westphal [1965] [24]. Для экстракции бактериальные клетки *F. tularensis* 15 НИИЭГ прогревали при температуре 68°C в 45% водном растворе фенола. После охлаждения смесь центрифугировали для разделения фаз. Водную фазу, содержащую ЛПС, осторожно отбирали и диализовали против дистиллированной воды в течение четырёх суток, контролируя процесс диализа путём определения изменения (уменьшения) значения оптической плотности раствора при длине волны 260 нм [25]. Очистку препаратов ЛПС от примесей нуклеиновых кислот проводили с использованием ферментов: ДНКазы и РНКазы. Инкубировали растворы ЛПС при температуре 37°C в течение 3–18 ч в присутствии трис-HCl до 10 мМоль (pH 7,2), сульфата магния до 10 мМоль, ДНКазы, РНКазы до 100 мкг/мл. Процесс гидролиза нуклеиновых кислот контролировали спектрометрически и по окрашиванию бромидом этидия электрофоретически разделённых образцов. Для очистки препаратов от белковых примесей использована протеиназа К (Sigma) в концентрации от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, инкубацию вели при температуре 65°C в течение 3–5 ч. После обработки ферментами проводили диализ препаратов против дистиллированной воды в течение дня со сменой воды каждые 2 ч. Для заключительной очистки ЛПС использовали ультрацентрифугирование при 100 тыс. g, которое проводили не менее четырёх раз, контролируя снижение содержания нуклеиновых кислот в супернатанте по уменьшению оптической плотности при 260 нм [26]. Очищенные препараты ЛПС лиофилизировали.

Определение примесей в препаратах ЛПС. Электрофоретический контроль препаратов ЛПС проводили по U. Laemmli [27] и O. Остерману [28] в 15% SDS-ПААГ. Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой в соответствии с рекомендациями C. Tsai и C. Frash [29]. Для визуализации белковых примесей использовали Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva). Концентрацию белков определяли по M. Bradford [30] и O. Lowry [31]. Содержание нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность при 260 нм [26], и дополнительно по окрашиванию препаратов бромидом этидия после электрофоретического разделения в 0,7% агарозном геле. Содержание белковых примесей в препаратах не превышало 3%, нуклеиновые кислоты отсутствовали.

Иммуноферментный анализ с использованием экспериментального диагностикума (ИФА ЛПС Ft15). Анализ проводили по стандартной методике [32]. В качестве антигена, сорбированного на планшет, использован полученный, как описано выше, ЛПС Ft15, который адсорбирован на иммунологические планшеты средней степени адсорбции (Nunc, Дания) в концентрации 1 мкг на лунку в карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,6 при температуре 4°C в течение 18 ч. Свободные центры связывания блоки-

ровали 5% раствором сухого обезжиренного молока (Fluka, Швейцария) в течение 30 мин при 37°C. Сыворотки (в исходном разведении 1:200) исследовали параллельно в двух рядах с двукратным шагом титрования. Планшеты с сыворотками инкубировали при 37°C в течение 1 ч с последующей четырёхкратной отмывкой 0,05% фосфатно-солевым раствором с твин-20 (ФБР-Т). Для выявления связанных антител использовали антиглобулиновую сыворотку козы против IgG человека, конъюгированную с пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия), в рабочем разведении 1:10000. Планшеты с антиглобулиновой сывороткой инкубировали при 37°C в течение 30 мин с последующей четырёхкратной отмывкой ФБР-Т. Для визуализации реакции использовали субстрат для пероксидазы ТМВ (Pierce). Учёт результатов проводили на спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

При постановке ИФА на каждом планшете предусматривали следующие контроли: отрицательная сыворотка в исходном разведении 1:200, положительная сыворотка в исходном разведении 1:200, контроль конъюгата, контроль субстратной смеси. За титр сыворотки принимали разведение, оптическая плотность которого при 450 нм (OP_{450}) превышала OP_{450} отрицательной сыворотки в том же разведении не менее чем в 2 раза. Положительными считались сыворотки с титром 1:400 и выше. Сыворотки с титром 1:200 интерпретировали как сомнительный результат.

Иммуноферментный анализ с использованием коммерческого диагностикума (ELISA IgG, SERION). Диагностикум «ELISA classic Francisella tularensis IgG» SERION, Германия; регистрационное удостоверение № ФСЗ 2012/12631 от 30.07.2012 (срок годности до 02. 2018) позволяет количественно определять человеческие IgG к туляремийному ЛПС. Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя –SERION, Германия.

РНГА. Для постановки РНГА использовали диагностикум РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ (серия 1-17, срок годности до 02. 2018) производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института (Россия), согласно инструкции производителя.

Конструирование и изготовление экспериментальных образцов (ИХ-тест ЛПС Ft15). При изготовлении ИХ-тестов основными технологическими этапами являются: получение/выбор материалов, золотоконьюгата, организация тестовой (содержащей антиген) и контрольной (содержащей рецептор к золотоконьюгату) зон. В тестовой зоне могут накапливаться специфические антитела против антигена (при их наличии в пробе) и золотоконьюгат, в контрольной (независимо от наличия антител в пробе) – золотоконьюгат, что и обеспечивает визуализацию результата. Выбор материалов проводили, учитывая следующие параметры: сорбционную ёмкость мембран, однородность формирующихся тестовых (Т) и контрольных (С) зон, равномерность продвижения фронта жидкости при анализе, уровень неспецифической сорбции золотоконьюгата на мембране. Для формирования тестовой зоны использован полученный как описано выше ЛПС Ft, для контрольной – кроличьи антитела IgG (ИМТЕК, Россия). Растворы ЛПС Ft и антител наносили диспенсером («IsoFlow», Imagine Technology, США) на нитроцеллюлозную мембрану 8 мкм в концентрации 0,5 мг/мл со скоростью нанесения 4 мм/с и объёмом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10% глицерин, 1% БСА и

Таблица 1
Результаты анализа сывороток крови вакцинированных против туляремии и здоровых людей на наличие антитюляремийных антител, полученные с помощью различных диагностикумов

Диагностикум	Количество исследованных сывороток, абс (%)			
	вакцинированных против туляремии (n = 94)		здоровых доноров (n = 15)	
	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция
ИФА ЛПС Ft15	86 (91,5%)	8 (8,5%)	0 (0%)	15 (100%)
ИХ-тест ЛПС Ft15	83 (88,3%)	11 (11,7%)	0 (0%)	15 (100%)
РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ	52 (55,3%)	42 (44,7%)	3 (20,0%)	12 (80,0%)
ELISA IgG, SERION	88 (93,6%)	6 (6,4%)	0 (0%)	15 (100%)

0,01% азид натрия. Раствор золотокоњюгата, коњюгированного с белком G (Arista Biologicals, США) наносили на стекловолоконные фильтры со скоростью 8 мм/с в объёме 1,6 мкл/мм. Мембраны после формирования (Т) и (С) зон подклеивали к фильтру с золотокоњюгатом, сорбирующей и поглощающей подушечкам (MDI, Индия), сушили на воздухе при 25% влажности и при температуре 30°C. Мембраны нарезали с помощью нарезчика стрипов (Index Cutter, США) на полоски шириной 0,5 см. Полоски герметично упаковывали и хранили до использования при температуре 4°C.

При постановке ИХ сыворотку крови человека предварительно разводили в 10 раз в 0,1 мл ФБР, вносили в лунку 96-луночного планшета и помещали в неё ИХ-тест. Учёт результатов проводили через 30 мин и интерпретировали по следующим критериям:

- положительный результат (наличие видимых глазом окрашенных линий в зоне С и Т;
- отрицательный результат (наличие окрашенной линии только в зоне С);
- тест не работает (отсутствие линии в зоне С даже при наличии окрашенной линии в зоне Т или отсутствие окрашенной линии в зоне С и в зоне Т).

Результаты и обсуждение. Протестировано 109 сывороток крови людей (от вакцинированных против туляремии, n = 94, и от здоровых доноров, n = 15). Выявление антитюляремийных антител в сыворотках крови проводили с помощью экспериментальных серодиагностикумов ИХ-тест ЛПС Ft15 и ИФА ЛПС Ft15 и зарегистрированного в РФ отечественного туляремийного серодиагностикума РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ. В качестве референс-диагностикума использован зарегистрированный в РФ ИФА-диагностикум для количественного определения IgG человека к ЛПС *Francisella tularensis* производства SERION, Германия. По результатам полученных экспериментальных данных проведён

сравнительный анализ чувствительности и специфичности различных диагностикумов. Результаты сравнительных исследований представлены в табл. 1.

Представленные в табл.1 данные свидетельствуют о том, что ИФА ЛПС Ft15 и ИХ-тест ЛПС Ft15 лишь незначительно уступают референс-диагностикуму ELISA IgG, SERION по чувствительности (ИФА на 2,1%, ИХ-тест на 5,3%). Более низкая чувствительность ИХ-тестов, обусловлена, вероятно, тем, что для данных тестов предел определения соответствует титрам антитюляремийных антител в ИФА 1:400.

Полученные в 6,4% случаев отрицательные результаты в группе сывороток вакцинированных людей (см. табл. 1), помимо чувствительности диагностикума, могут быть объяснены тем, что количество специфических антител в сыворотке крови вакцинированных зависит от качества вакцинации, сроков забора проб сывороток, индивидуальных особенностей иммунного ответа, когда, например, клеточно-опосредованный иммунитет, стимулируемый преимущественно антигенами белковой природы, может преобладать над гуморальным иммунитетом и не наблюдается корреляции между напряжённостью клеточного ответа и уровнем синтезируемых антител. [33–36].

Полученные данные позволили оценить чувствительность и специфичность ИФА ЛПС Ft15, ИХ-тест ЛПС Ft15 и РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ относительно референс-диагностикума ELISA IgG, SERION (табл. 2).

Относительную чувствительность оценивают как способность диагностического метода давать истинный результат и определяют как отношение положительных результатов, определяемых экспериментальной тест-системой, к положительным результатам референсной тест-системы [37]. Соответственно под *специфичностью* понимают способность диагностического метода не давать ложноположительных результатов [37]. Расчёт относительной чувствительности проводят по формуле 1, относительной специфичности – по формуле 2.

$$\text{Чувствительность} = \frac{N \text{ полож. тестируемых}}{N \text{ полож. референс "SERION"}}, \text{ (формула 1)}$$

где N полож. тестируемых – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых тест-систем, N полож. референс «SERION» – количество положительных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой «ELISA IgG, SERION».

$$\text{Специфичность} = \frac{N \text{ отриц. тестируемых}}{N \text{ отриц. референс "SERION"}}, \text{ (формула 2)}$$

где N отриц. тестируемых – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых тест-систем;

N полож. референс «ELISA IgG, SERION» – количество отрицательных результатов при определении специфических антител в сыворотках тестируемых референсной системой ELISA IgG, SERION.

Как видно из табл. 2, оба экспериментальных теста показывают 100% специфичность. Чувствительность экспериментальной «ИФА ЛПС Ft15» по отношению к референсной «ELISA IgG, SERION» составила 97,7%, а чувствительность «ИХ-тест ЛПС Ft15» – 94,3%. Чув-

Таблица 2

Чувствительность и специфичность экспериментальных тест-систем и РНГА относительно чувствительности коммерческой ИФА тест-системы при выявлении антитюляремийных антител в сыворотках крови вакцинированных людей

Тест-система	Чувствительность, %	Специфичность, %
ИФА ЛПС Ft15	97,7	100
ИХ-тест ЛПС Ft15	94,3	100
РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ	59,1	80

ствительность «РНГА-Тул-Аг-СтавНИПЧИ» оказалась относительно низкой – всего лишь 59,1% при специфичности в 80%, Наиболее чувствительным методом анализа, как показало исследование, является ИФА. Результаты, полученные с использованием экспериментальной и коммерческой ИФА тест-систем, наиболее близки во всех исследованных группах. «ИХ-тест ЛПС Ft15» при высокой специфичности показал в исследовании чувствительность, несколько меньшую, чем ИФА. С учётом простоты проведения и быстроты получения результатов (30 мин) ИХ-тест имеет большие перспективы для широкого использования в эпидемиологических исследованиях.

Более низкие показатели чувствительности и специфичности РНГА-диагностикума могут быть связаны с тем, что для изготовления сенсibilизированных эритроцитов – основного компонента РНГА, используют целые клетки *Francisella tularensis*. При конъюгации бактерий с эритроцитами могут повреждаться те эпитопы ЛПС, к которым выработаны антитела, что снижает способность сенсibilизированных эритроцитов взаимодействовать со специфическими иммуноглобулинами сывороток и снижает показатель чувствительности. На поверхности бактерий остаётся активным ряд неспецифических эпитопов, общих для некоторых грамотрицательных микроорганизмов, в частности бруцелл, иерсиний, эшерихий, что обуславливает перекрестные реакции с соответствующими сыворотками и ведёт к снижению специфичности. Цельные бактериальные клетки с трудом поддаются стандартизации, что ухудшает воспроизводимость реакции от партии к партии производимого диагностикума [14; 38].

Можно сделать вывод о том, что благодаря простоте и достаточно высокой чувствительности разработанные ИХ- и ИФА-тесты можно использовать при контроле эффективности вакцинации больших групп людей и расследовании вспышек туляремии. Использование ИХ-тестов на основе ЛПС Ft позволит без специального оборудования и наличия квалифицированного персонала быстро выявлять антитела к возбудителю туляремии в сыворотках людей с диагностически значимыми титрами ИФА (1:400 и выше). Применение таких тестов для экспресс-диагностики туляремии открывает новые перспективы в решении задач практического здравоохранения, в частности, они могут использоваться для проведения эпидемиологических исследований, серологических исследований в полевых условиях, у постели больного. С учётом подтверждённой в данной работе перспективности ИХ-теста на основе ЛПС Ft15 для серодиагностики туляремии запланирована подготовка его для проведения испытаний и государственной регистрации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках диссертационной работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1,5,6,7,12,21,28,32,37
см. REFERENCES)

1. Бачинский А.Г., Низоленко Л.Ф. Оценка влияния мер противодействия на последствия локальных эпидемий, вызываемых возбудителями особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2: 9-12.
5. Павлов В.М., Козлова И.И., Мокриевич А.Н., Шутко О.Д., Тимофеев В.С., Миронова Р.И., Кузнецова Т.С., Файзуллина Н.М.,

Кудрявцева Т.Ю., Комбарова Т.И., Дятлов И.А. Характеристика штаммов туляремийного микроба, выделенных от больных людей и мелких грызунов во время эпидемии туляремии в Ханты-Мансийске в 2013 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 2: 58-62.

6. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке на территории Ханты-Мансийского автономного округа – Югры в 2013 году». Югра: Управление Роспотребнадзора по ХМАО-Югре; 2014.
7. Боронина Л.Г., Лакно Т.И., Борзунов В.М., Чмелёв С.А. Активация очагов туляремии в уральском федеральном округе. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции - «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии». СПб.: Человек и его здоровье; 2017.
12. Сырова, Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2008; 97: 12–15.
21. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Сравнительный анализ иммунного ответа кролика на антигены живых и убитых бактерий рода *Francisella*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2001; 2: 26-30.
28. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука; 1981.
32. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. и др. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая Школа; 1991.
37. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998.

REFERENCES

1. Bachinsky A.G., Nizolenko L.F. Assessment of the impact of countermeasures on the effects of local epidemics caused by pathogens of especially dangerous infections. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 2: 9-12. (in Russian)
2. Rotz, L.D., Khan A.S., Lillibridge S.R., Ostroff S.M., Hughes J.M. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg. Infect. Dis*. 2002; 14(2): 225-30.
3. Oyston P.C., Sjostedt A., Titball R.W. Tularemia: bioterrorism defense renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol*. 2004 ; 2: 967-78.
4. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev. Anti Infect. Ther*. 2015; 13: 141-4.
5. Pavlov V.M., Kozlova I.I., Mokrievich, A.N., Shutko O.D., Timofeev V.S., Mironova R.I., Kuznetsova T.S., Faizullina N.M., Kudryavtseva T.Yu., Kombarova T.I., Dyatlov I.A. Characteristics of Tularemia Agent Strains Isolated from Patients and Small Rodents during Tularemia Epidemic in Khanty-Mansiisk in 2013. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 2: 58-62. (in Russian)
6. State report «On sanitary and epidemiological situation in Khanty-Mansiysk Autonomous Okrug – Yugra in 2013». Yugra: Upravlenie Rospotrebnadzora po KHMAO-Yugra; 2014. (in Russian)
7. Boronina L. G., Lakhno T. I., Borzunov V. M., Shmelev S. A. Activation of tularemia foci in the Ural Federal district. Collection of materials of the all-Russian scientific-practical conference – «Innovations in medical, pharmaceutical, veterinary and environmental Microbiology». St.Peterbug: Chelovek i ego zdorov'e; 2017. (in Russian)
8. Hepburn M.J., Simpson A.H. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6: 231-40.
9. Tärnvik A., Chu M.C. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2007; 1105: 378-404.
10. Karagöz S., Kiliç S., Berk E., Uzel A., Çelebi B., Çomoğlu Ş., Karagöz A., Akyar I., Can S. *Francisella tularensis* bacteremia: report of two cases and review of the literature. *New Microbiol*. 2013; 36: 315-23.
11. Shapiro D.S., Schwartz D.R.. Exposure of laboratory workers to *Francisella tularensis* despite a bioterrorism procedure. *J.Clin. Microbiol*. 2002; 40: 2278-81.
12. Syrova N. A., Tereshkina N. Y., Devdariani Z. L. Current state of immunodiagnosics of tularemia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 97: 12-5. (in Russian)

13. Schmitt P., Spletstoesser W., Porsch-Ozcürümez M., Finke E.J., Grunow R. A novel screening ELISA and a confirmatory Western blot useful for diagnosis and epidemiological studies of tularemia. *Epidemiol. Infect.* 2005; 133: 759-66.
14. Yanes, H. et al. Evaluation of in-house and commercial serological tests for diagnosis of human tularemia. *J.Clin. Microbiol.* 2018; 56: 1440-7.
15. Behan K.A., Klein G.C. Reduction of Brucella species and Francisella tularensis cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. *J. Clin. Microbiol.* 1982; 16: 757-6.
16. Bevanger L., Maeland J.A., Naess A.I. Agglutinins and antibodies to Francisella tularensis outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 433-7.
17. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W., Tomaso H. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infectious Diseases.* 2014; 14: 234.
18. Kilic S., Celebi B., Yesilyurt M. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for the serologic diagnosis of tularemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 2012; 74 (1): 1-5.
19. Porsch-Ozcürümez M., Kischel N., Priebe H., Spletstoesser W., Finke E.J., and Grunow R. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, Western blotting, microagglutination, indirect immunofluorescence assay, and flow cytometry for serological diagnosis of tularemia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11: 1008-15.
20. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Fujita O., Uda A., Morikawa S., Yamada A., Tanabayashi K. Detection of Francisella tularensis-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20: 9-16.
21. Aronova N. V., Pavlovich N. V. Comparative analysis of the immune response of a rabbit to antigens to live and killed Francisella species bacteria *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologia i virusologia.* 2001; 2: 26-30. (in Russian)
22. Sandstrom G., Sjostedt A., Johansson T., Kuoppa K., and Williams J. C. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from Francisella tularensis LVS. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1992; 5: 201-10.
23. Spletstoesser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of Francisella tularensis-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(5): 1629-34.
24. Westphal O., Jann K. Bacterial Lipopolysaccharides. Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry.* 1965; 5: 83-91.
25. Wetmur J.G., Davidson N.J. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 1968; 31: 349.
26. Twine S.M., Petit M.D., Fulton K.M., House R.V., Conlan J.W., Tripp R., eds. Immunoproteomics Analysis of the Murine Antibody Response to Vaccination with an Improved Francisella tularensis Live Vaccine Strain (LVS). *PLoS ONE.* 2010; 5: 100-2.
27. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
28. Osterman L.A. Methods of research of proteins and nucleic acids: Electrophoresis and ultracentrifugation (practical guide) [Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot](prakticheskoe posobie). Moscow: Nauka; 1981. (in Russian)
29. Tsai C.M., Frash C.E. A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1982; 119.
30. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein. Utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
31. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 115-9.
32. Egorov A. M., Osipov A. P., Dzantiev B. B., etc. Theory and practice of enzyme immunoassay [Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza]. Moscow: Vysshaya shkola; 1991. (in Russian)
33. Sandstrom G., Tarnvik A., Wolf-Watz H., and Lofgren S. Antigen from Francisella tularensis: nonidentity between determinants participating in cell-mediated and humoral reactions. *Infect. Immun.* 1984; 45: 101-6.
34. Koskela P., and Herva E. Cell-mediated immunity against Francisella tularensis after natural infection. *Scand. J. Infect. Dis.* 1980; 12: 281-7.
35. Tarnvik A., Lofgren M. L., Lofgren S., Sandstrom G., and Wolf-Watz H. Long-lasting cell-mediated immunity induced by a live Francisella tularensis vaccine. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 527-30.
36. Tarnvik A., and Lofgren S. Stimulation of human lymphocytes by a vaccine strain of Francisella tularensis. *Infect. Immun.* 1975; 12: 951-7.
37. Glants S. Medico-biological statistics [Mediko-biologicheskaya statistika]. Moscow: Praktika; 1998. (in Russian)
38. Sharma N., Hotta A., Yamamoto Y., Uda A., Fujita O., Mizoguchi T., Shindo J., Park C.H., Kudo N., Hatai H., Oyamada T., Yamada A., Morikawa S., Tanabayashi K. Serosurveillance for Francisella tularensis among wild animals in Japan using a newly developed competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(4): 234.

Поступила 17.07.18
Принята к печати 10.10.18