

# Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей

Т.В.Жарникова, И.В.Жарникова, Ю.М.Евченко

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора», Ставрополь, Российская Федерация

Усовершенствована биотехнология получения иммуноглобулинов флуоресцирующих диагностических за счет использования разработанных бифункциональных сорбентов на носителях отечественного производства, позволяющих проводить одномоментную очистку иммуноглобулинов от несвязавшегося красителя и гетерологичных антител. Данная технология сокращает производственный цикл, обеспечивает низкую себестоимость, экологическую безопасность с сохранением качества диагностических препаратов.

Проведено совершенствование иммунопероксидазного конъюгата для выявления возбудителя туляремии путем иммобилизации фермента-пероксидазы хрена с липосомами, что способствует повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы. Получены высокоактивные, специфичные иммобилизованные иммунопероксидазные конъюгаты, стабильные в течение 6 лет хранения (срок наблюдения), что в 6 раз превышает стабильность препарата, полученного традиционным методом.

**Ключевые слова:** иммуноглобулины флуоресцирующие, сорбент, флуоресцеинизотиоцианат, реакция иммунофлуоресценции, хроматографическая очистка, фермент, липосомы, иммунопероксидазный конъюгат

**Для цитирования:** Жарникова Т.В., Жарникова И.В., Евченко Ю.М. Совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей. Бактериология. 2018; 3(1): 55–58. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58

## Improvement of biotechnological processes for the production of diagnostic products for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized media

T.V.Zharnikova, I.V.Zharnikova, Y.M.Yevchenko

Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol, Russian Federation

Improved biotechnology for the production of immunoglobulins diagnostic fluorescent through the use of designed bifunctional sorbents on the media of domestic production, allowing for single-step purification of immunoglobulins from unbound fluorescent dye and heterologous antibodies. The technology used helps to reduce the production cycle by providing low cost, environmental safety, preserving the quality of diagnostic products.

Improvement of immunoperoxidase conjugate for detection of tularemia pathogen by immobilization of enzyme-horseradish peroxidase with liposomes was carried out, which contributes to stability and increase the shelf life of the diagnostic system. Highly active, specific immobilized immunoperoxidase conjugates stable for six years of storage (observation period) were obtained, which is 6 times higher than the stability of the drug obtained by the traditional method.

**Key words:** Immunoglobulins fluorescent, absorbent, fluoresceinisothiocyanate, the reaction immunofluorescence assay, chromatographic purification, enzyme, liposomes, immunoperoxidase conjugate

**For citation:** Zharnikova T.V., Zharnikova I.V., Yevchenko Y.M. Improvement of biotechnological processes for the production of diagnostic products for the detection of the causative agent of tularemia using immobilized media. Bacteriology. 2018; 3(1): 55–58. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-1-55-58

### Для корреспонденции:

Жарникова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, химик-эксперт лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Телефон: (865-2) 26-0337

E-mail: stavnipchi@mail.ru

Статья поступила 19.01.2018 г., принята к печати 30.03.2018 г.

### For correspondence:

Tatiana V. Zharnikova, PhD (Biol.), chemist-expert, specialist training laboratory, Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation

Phone: (865-2) 26-0337

E-mail: stavnipchi@mail.ru

The article was received 19.01.2018, accepted for publication 30.03.2018

**А**ктуальными остаются задачи по снижению и ликвидации инфекционных заболеваний, в связи с этим основные направления биотехнологии предусматривают получение высокоэффективных, специфических препаратов для экспресс-диагностики особо опасных и других инфекций, а также индикации их возбудителей.

Для выявления возбудителя туляремии применяются различные серологические методы: реакция иммунофлуоресценции (РИФ); иммуноферментный анализ (ИФА) и т.д. Одним из основных компонентов диагностических препаратов являются конъюгат-иммуноглобулины, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) или ферментом пероксидазой хрена.

Для получения специфичных, стабильных, качественных диагностических препаратов необходимо выполнение основных правил:

- использование специфичных антител для иммобилизации;
- качественная хроматографическая очистка конъюгатов от несвязавшихся компонентов;
- стабилизация препаратов.

Традиционно для выполнения вышеперечисленных пунктов применяются импортные дорогостоящие, а иногда высокотоксичные реактивы.

В настоящее время существует целый спектр применяемых сорбентов и методов иммобилизации, имеющих свои достоинства и недостатки [1–3].

**Цель исследования** – совершенствование биотехнологических процессов получения диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии с использованием иммобилизованных носителей на основе отечественных реактивов.

Задачи исследования:

1. совершенствование биотехнологических процессов получения иммуноглобулинов флуоресцирующих для выявления возбудителя туляремии путем применения бифункциональных аффинных сорбентов;
2. разработка технологии получения стабильного иммунопероксидазного конъюгата за счет иммобилизации фермента и иммуноглобулинов с липосомами.

## Материалы и методы

Первоначально использовали различные сорбенты, технология приготовления которых описана в наших предыдущих работах [4, 5]. Для упрощения и ускорения процесса приготовления сорбентов и их использования для очистки препарата от несвязавшегося ФИТЦ были сконструированы сорбенты с магнитными свойствами.

При выделении иммуноглобулинов [6] использовали сывротку диагностическую туляремийную сухую для РА производства ФКУЗ «Иркутский государственный научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (ОСО 42-28-28-84-01 П). Концентрацию белка иммуноглобулинов флуоресцирующих определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 280$  нм (максимум поглощения белка) и  $\lambda = 495$  нм (максимум поглощения ФИТЦ). Очистку от несвязавшегося флуорохрома проводили методом восходящей хроматографии на бумаге. Учет результа-

тов в РИФ проводили на люминесцентном микроскопе «PRIMO STAR iLED».

Конъюгацию иммуноглобулинов с ферментом пероксидазой хрена фирмы Sigma (США), тип VI-A, Rz = 3, проводили после его активирования методом перйодатного окисления по Р.К.Nakane, А.Кawaoi (1974) [7]. Лиофилизацию препаратов осуществляли в камере ЛС-500 («Проинтех», Россия) под вакуумом.

При контроле активности и специфичности диагностических препаратов в качестве гомологичных штаммов использовали: *Francisella (F.) tularensis Miura*, *F. tularensis* 890-Аз, *F. tularensis* Schu, *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В качестве гетерологичных штаммов применяли: *Brucella (B.) abortus* 544, *B. abortus* 19-BA, *B. melitensis* 16 M, *B. melitensis* 62/9, *B. suis* 1330, *B. suis* 6, *Yersinia pseudotuberculosis* I-II серовар, *Escherichia (E.) coli* 0-10, *E. coli* 0-18.

Для иммобилизации ферментов использовали липосомы со средним размером 200 нм, полученные методом «выпаривания в обращенной фазе» из фосфолипидов. Чувствительность и специфичность конъюгатов определяли по методике М.Clark и А.Adams (1977) в «сэндвич»-варианте ИФА [8]. В работе использовали полистироловые планшеты для иммунологических реакций (Санкт-Петербург, Россия). Учет результатов проводили на фотометре Multiskan FC (Финляндия).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли, оценивая дисперсию, стандартное отклонение, доверительный интервал выборки из результатов эксперимента, с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2007.

## Результаты и обсуждение

Одним из основных экспресс-методов является РИФ, в которой используются иммуноглобулины флуоресцирующие диагностические. Они должны обладать высокой специфичностью, т.е. взаимодействовать только с гомологичным антигеном и сообщать яркую флуоресценцию образуемому комплексу. Для этого применяются хроматографические методы очистки. С целью освобождения иммуноглобулинов от несвязавшегося красителя используется сефадекс G-25 или сефадекс G-50 [9]. Для истощения иммуноглобулинов от гетерологичных антител – полиакриламидные сорбенты с иммобилизованными антигенами из гетерологичных штаммов. При этом применяются импортные дорогостоящие реактивы, а во втором случае – высокотоксичные.

В связи с этим нами разработана технология получения бифункционального аффинного сорбента, выполняющего одновременно две функции: очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя ФИТЦ и сорбцию гетерологичных антител путем связывания с антигенным лигандом, конъюгированным с матрицей и представляющим собой водорастворимый антиген, дающий перекрестную реакцию с соответствующими иммуноглобулинами. Используемые при этом сорбенты – биологически и химически инертные, микробиологически устойчивые, механически прочные, стабильные.

В качестве сорбента использовали: синтезированные органокремнеземные носители, состоящие из алюмосили-

ката, оксида железа и декстрана. Для сравнения применяли традиционно используемый сефадекс G-50. Сорбция ФИТЦ на сефадексе была  $92 \pm 2\%$ , на разработанном органокремнеземном сорбенте –  $90 \pm 2\%$ .

Для придания сорбентам биоспецифических свойств на их поверхность иммобилизовали водорастворимые антигены, полученные из гетерологичных штаммов: *B. abortus* 544, *B. abortus* 19–BA.

Всего было проанализировано по 3 серии иммуноглобулинов флуоресцирующих туляреминых, очищенных с помощью аффинного сорбента с магнитными свойствами, с концентрацией белка 1,0–1,1% и молярным отношением Мф/Мб (нагрузка красителя на белок) от 5,0 до 9,0.

Установлено, что специфическая активность препаратов, очистку которых проводили с помощью бифункциональных аффинных сорбентов, составила 1:32–1:64, чувствительность –  $5 \times 10^5$  и более микробных клеток в 1 мл при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами.

При сравнительном изучении в РИФ активности и специфичности иммуноглобулинов флуоресцирующих туляреминых, полученных традиционным (с помощью сефадекса G-50) и модифицированным методами, установлена сопоставимость полученных результатов, а с учетом снижения материальных затрат и импортозамещения превосходство предложенного нами метода становится очевидным.

Вторым перспективным экспресс-методом является ИФА. Однако его недостаток – непродолжительный срок годности иммуноферментного конъюгата (6–12 мес при надлежащем хранении в холодильнике), так как ферменты имеют слабую жесткую структуру и подвержены отрицательному влиянию внешних факторов среды: температурных, буферных изменений, концентрации водородных ионов и т.д.

Для решения данной проблемы необходимо выбрать носитель и подобрать параметры, при которых процедура иммобилизации не инактивировала бы фермент, позволяя ему функционировать с высокой активностью. Данными свойствами обладают липосомы [10].

При получении липосомально-иммунопероксидазного конъюгата предварительно активировали фермент методом периодатного окисления. Данная процедура приводила к образованию альдегидных групп в углеводной части фермента пероксидазы хрена. В дальнейшем на наружной мембране липосом фермент фиксировали. Суспензию подвергали ультразвуковой обработке, обеспечивающей эффективный контакт поверхности липидной мембраны липосом с ферментом, после чего смесь инкубировали при температуре  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Ковалентное связывание липосом с ферментом осуществлялось за счет части активированных групп пероксидазы и аминок групп, присутствующих в молекулах ганглиозидов, встроенных в мембрану липосом при их приготовлении. Фиксацию иммуноглобулинов на поверхности липосом с иммобилизованной пероксидазой хрена проводили при температуре  $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Препарат стабилизировали 5 мг боргидрида в холодильнике. При этом иммуноглобулины за счет свободных аминок групп связывались с оставшимися свободными альдегидными группами углеводной части пероксидазы. Для очистки конъюгата от несвязавшихся иммуноглобулинов использовали гель-хроматографию.

В целях увеличения срока годности препараты разливали в ампулы, замораживали и лиофилизировали в течение  $(18 \pm 2)$  ч до конечной температуры  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

В результате проведенных исследований разработана технология изготовления иммобилизованных ферментных препаратов, значительно увеличивающая их стабильность. Это связано с тем, что, во-первых, иммобилизация эффективно препятствует вредному воздействию внешней среды на ферментный препарат, он становится заключенным в носитель (липосомы), т.е. защищенным, при отсутствии каталитических ограничений, т.е. матрица не препятствует проникновению к нему субстрата за счет эффективного метода получения липосом, включения фермента и иммобилизации антигенов, подбора температурных, временных параметров, проведения щадящей очистки от несвязавшихся компонентов.

В готовых диагностических препаратах контролировали физико-химические (растворимость, цветность, прозрачность, потерю в массе при высушивании) и иммунологические свойства (рабочий титр, специфичность, чувствительность) после лиофилизации и в процессе хранения.

Разработанные препараты удовлетворяли требованиям к диагностическим препаратам, а стабильность разработанных иммуноферментных конъюгатов превосходила аналогичный показатель традиционных, срок годности которых не превышал 1 года.

Чувствительность иммунопероксидазных конъюгатов составила  $5 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  м.к./мл при отсутствии перекрестных реакций с гетерологичными штаммами, что свидетельствовало об их высокой специфичности.

## Заключение

В результате экспериментов были получены специфичные, высокоактивные диагностические препараты.

1. Иммуноглобулины флуоресцирующие туляреминые.

Бифункциональность свойств сорбентов позволяла выполнять две задачи. Первая состояла в освобождении иммуноглобулинов флуоресцирующих от несвязавшегося красителя – в результате физической сорбции последнего на сорбенте. Вторая задача включала очистку иммуноглобулинов флуоресцирующих от гетерологичных антигенов за счет аффинных взаимодействий последних, входящих в состав иммуноглобулинов и соответствующих антигенов, фиксированных на аффинном сорбенте. Отработанная при этом методика может быть использована как основа для получения высокоактивных, специфических иммуноглобулинов флуоресцирующих при выявлении возбудителей других инфекций.

Таким образом, простота технологии, при которой очистка от несвязавшегося красителя и гетерологичных антигенов производится в одну стадию, способствует сокращению производственного цикла. Предложенная технология позволяет обеспечить низкую себестоимость, экологическую безопасность с сохранением качества диагностических препаратов.

2. Иммунопероксидазный конъюгат.

Фиксируясь на поверхности твердофазных носителей (мембраны липосом), фермент и иммуноглобулины резко снижают способность к конформационным изменениям структуры своих молекул под воздействием повышенной температуры, изменений pH среды и т.д. Все это способ-

ствуется повышению стабильности и увеличению срока годности диагностической системы, в 6 раз превышающего срок годности препарата, полученного по традиционной методике.

Таким образом, в результате проведенных исследований изготовлены высокочувствительные ( $5 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$  м.к./мл), специфичные (отсутствуют перекрестные реакции с гетерологичными штаммами) диагностические препараты для выявления возбудителя туляремии: иммуноглобулины флуоресцирующие и иммунопероксидазный конъюгат.

## Литература

1. Butnariu M, Negrea P, Lupa L, Ciopes M, Negrea A, Pentea M, Sarac I, Samfira I. Remediation of Rare Earth Element Pollutants by Sorption Process Using Organic Natural Sorbents. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Sep 10;12(9):11278-87. DOI: 10.3390/ijerph120911278
2. Marwa Elkady, Hassan Shokry Hassan, Aly Hashim Immobilization of Magnetic Nanoparticles onto Amine-Modified Nano-Silica Gel for Copper Ions Remediation. *Материалы*. 2016. № 9. 460. [http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium](http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm_source=TrendMD&utm_medium)
3. Khlyntseva AE, Belova EV, Zharnikova IV, Tyumentseva IS, Kulichenko AN, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Design of a Test System Based on Magnetic Particles with Immobilized Monoclonal Antibodies for Selective Bacillus anthracis Spore Concentration. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(7):700-6.
4. Тюменцева ИС, Жарникова ИВ, Афанасьев ЕН, Ефременко ВИ, Коготкова ОИ, Кальной СМ, Куличенко АН. Научно-методические разработки биотехнологий производства иммунобиологических препаратов для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний и детекции их возбудителей. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2015;4(56):21-5.
5. Жарникова ТВ, Ковалев ДА, Жарникова ИВ, Таран ТВ, Михайлова МЕ. Совершенствование биотехнологических процессов получения иммуноглобулинов флуоресцирующих диагностических для выявления возбудителей туляремии и бруцеллеза. *Технологии живых систем*. 2017;14(3):58-62.
6. Steibuch G, Audran R. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic. *Arch Biochem Biophys*. 1969 Nov;134(2):279-84.
7. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1974 Dec;22(12):1084-91. DOI: 10.1177/22.12.1084
8. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J Gen Virol*. 1977 Mar;34(3):475-83. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475
9. Ибрагимов АН, Бикмуллин АГ, Сатаева ДА, Лопухов ЛВ, Зайнуллин ЛИ, Алимova ФК. Хроматографические методы очистки белков. Учебно-методическое пособие. Казань: ФГАОУВПОКФУ, 2013, 48 с.
10. Ефременко ВИ. Липосомы. Монография. Ставрополь, 1999, 236 с.

## References

1. Butnariu M, Negrea P, Lupa L, Ciopes M, Negrea A, Pentea M, Sarac I, Samfira I. Remediation of Rare Earth Element Pollutants by Sorption Process Using Organic

- Natural Sorbents. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Sep 10;12(9):11278-87. DOI: 10.3390/ijerph120911278
2. Marwa Elkady, Hassan Shokry Hassan, Aly Hashim Immobilization of Magnetic Nanoparticles onto Amine-Modified Nano-Silica Gel for Copper Ions Remediation. *Материалы*. 2016. № 9. 460. [http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm\\_source=TrendMD&utm\\_medium](http://www.mdpi.com/1996-1944/9/6/460?utm_source=TrendMD&utm_medium)
3. Khlyntseva AE, Belova EV, Zharnikova IV, Tyumentseva IS, Kulichenko AN, Dyatlov IA, Shemyakin IG. Design of a Test System Based on Magnetic Particles with Immobilized Monoclonal Antibodies for Selective Bacillus anthracis Spore Concentration. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(7):700-6.
4. Tyumentseva IS, Zharnikova IV, Afanasiev EN, Efremenko VI, Kogotkova OI, Kalnoy SM, Kulichenko AN. Scientific and methodical development of biotechnological production of immunobiological preparations for instant diagnosis of infectious diseases and detection of pathogens. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;4(56):21-5. (In Russian).
5. Zharnikova TV, Kovalev DA, Zharnikova IV, Taran TV, Mikhailova ME. Improvement of biotechnological processes for the production of immunoglobulins diagnostic fluorescent for identification of causative agents of tularemia and brucellosis. *Journal Technologies of Living Systems*. 2017;14(3):58-62. (In Russian).
6. Steibuch G, Audran R. The isolation of IgG from imanalion serra with the acid of caprilic. *Arch Biochem Biophys*. 1969 Nov;134(2):279-84.
7. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labelled antibody-a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1974 Dec;22(12):1084-91. DOI: 10.1177/22.12.1084
8. Clark MF, Adams AN. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J Gen Virol*. 1977 Mar;34(3):475-83. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475
9. Ibragimov AN, Bikmullin AG, Sataeva DA, Lopukhov LV, Zainullin LI, Alimova FK. *Хроматографические методы очистки белков*. Kazan, 2013, 48 p. (In Russian).
10. Efremenko VI. *Liposomy. Monografiya*. Stavropol, 1999, 236 p. (In Russian).

### Информация о соавторах:

Жарникова Ирина Викторовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
Телефон: (865-2) 26-0312  
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Евченко Юрий Михайлович, врач-эпидемиолог лаборатории подготовки специалистов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора  
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15  
Телефон: (865-2) 26-0337  
E-mail: stavnipchi@mail.ru

### Information about co-authors:

Irina V. Zharnikova, Dr. Sci. (Biol.), leading research worker of science-practical laboratory of preparations for diagnostic of dangerous and other infections, Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation  
Phone: (865-2) 26-0312  
E-mail: stavnipchi@mail.ru

Yuri M. Yevchenko, physician-epidemiologist, specialist training laboratory, Stavropol Antiplague Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare  
Address: 13-15 Sovetskaya str., Stavropol, 355035, Russian Federation  
Phone: (8652) 26-0337  
E-mail: stavnipchi@mail.ru