

А.А.Будченко

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МЕЛИОИДОЗА И САПА НА ОСНОВЕ РЕАКЦИИ ПАССИВНОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Представлен анализ публикаций результатов изучения влияния различных антигенов *Burkholderia pseudomallei* и *B. mallei* на операционные характеристики (чувствительность и специфичность) тестов для диагностики мелиоидоза и сапа на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа. Рассмотрены способы выделения двух типов антигенов: лизатных (получены путем лизиса клеток бактерий) и рекомбинантных (получены генно-инженерным способом, аналоги определенных антигенов возбудителя). Показаны перспективы получения универсальных антигенов *B. pseudomallei* и *B. mallei* для тест-систем на основе реакции пассивной гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного анализа и применения их для эффективной диагностики мелиоидоза и сапа в эндемичных регионах.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 86—95

Ключевые слова: мелиоидоз, сап, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, антигены, антитела, диагностика, реакция пассивной гемагглютинации, твердофазный иммуноферментный анализ, чувствительность, специфичность

А.А.Будченко

EFFECTIVENESS OF A TEST-SYSTEM FOR DIAGNOSTICS OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS BASED ON PASSIVE HEMAGGLUTINATION REACTION AND SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY

Volgograd Research Institute of Plague Control, Russia

Analysis of published results of studies of effect of various antigens of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei* on operation characteristics (sensitivity and specificity) of tests for diagnostics of melioidosis and glanders based on reaction of passive hemagglutination and solid-phase enzyme immunoassay is presented. Methods of isolation of 2 types of antigens are examined: lysate (obtained by lysis of bacterial cells) and recombinant (obtained by genetic engineering, analogues of the determined antigens of the causative agent). Perspectives of production of universal antigens of *B. pseudomallei* and *B. mallei* for test-systems based on passive hemagglutination and solid-phase enzyme immunoassay and their application for effective diagnostics of melioidosis and glanders in endemic regions are shown.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 4, P. 86—95

Key words: melioidosis, glanders, *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, antigens, antibodies, diagnostics, passive hemagglutination reaction, solid-phase enzyme immunoassay, sensitivity, specificity

Мелиоидоз и сап — опасные болезни человека и животных, возбудители которых, бактерии рода буркхольдерий *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, относятся ко второй группе патогенности (опасности) [6]. Мелиоидоз — инфекция, эндемичная в районах Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, в Российской Федерации не регистрировалась. Эпизотии сапа в последние годы отмечены в Монголии, Иране, Ираке, Турции. В Российской

Федерации сап ликвидирован в начале XX века [7]. Однако с увеличением миграции населения и развитием туризма в эти страны становится возможным завоз возбудителей сапа и мелиоидоза в Российскую Федерацию. Кроме того, эти возбудители с 40-х годов прошлого века являлись агентами бактериологического (биологического) оружия [35]. Мелиоидоз — инфекция из группы сапронозов, характеризуется острой или хронической септикопиемией. Заболевание может протекать в септической, легочной, латентной и рецидивирующей форме [15]. Без своевременного лечения летальность от заболевания часто близка к 100%. Ввиду полиморфизма клинических проявлений болезни диагностика мелиоидоза часто оказывается затруднительной. Несмотря на то, что «золотым стандартом» постановки диагноза мелиоидоза и сапа является выделение от больного культуры возбудителя, в эндемичных по этим заболеваниям регионах для ускоренной диагностики применяют реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) [30, 33]. Эти же методы совместно с ПЦР составляют основную группу методов индикации возбудителей мелиоидоза и сапа [3].

Сенсибилизация эритроцитов и лунок полистироловых панелей антигенами (Аг) — один из основных этапов РПГА и ТИФА, при котором на эритроцитах и стенках лунок адсорбируются Аг [19]. После внесения в эти лунки образцов (сывороток) на поверхности эритроцитов и стенках лунок формируются иммунные комплексы, которые и выявляются в РПГА характерной агглютинацией эритроцитов, в ТИФА — изменением цвета смеси реагентов [4].

Основным требованием к диагностическим тест-системам является их способность со 100% чувствительностью и 100% специфичностью диагностировать инфекцию. В тест-системах на основе РПГА и ТИФА это достигается соблюдением требуемых условий прохождения реакций и подбором реагентов: Аг, антител (Ат), эритроцитов. При этом, основным реагентом, доступным для подбора, является Аг, который получают и очищают различными способами. В зависимости от используемых Аг рассматриваемые тест-системы делятся на три типа: 1) лизатные (используется Аг, полученный лизированием бактериальной массы возбудителя инфекции); 2) рекомбинантные (в качестве Аг используются полученные генно-инженерным способом протеины — аналоги белковых Аг возбудителя); 3) пептидные (в качестве Аг применяются синтезированные протеины) [2]. К настоящему времени основательно разработаны первые два типа тест-систем.

В обзоре проведен анализ опубликованных результатов изучения влияния Аг *B. pseudomallei* и *B. mallei*, полученных и очищенных, на эффективность лизатных и рекомбинантных тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа на основе РПГА и ТИФА.

После разработки в 50-х годах прошлого века метод РПГА успешно применялся для диагностики мелиоидоза у людей [12] и животных (свиней, овец, коз [19, 22, 32]) в эндемичных по данной инфекции районах. Аг получали по методике Rise С.Е. et al. [28]. При этом изучались, в основном, чувствительность и специфичность метода в зависимости от взятых для анализа иммунных сывороток или сывороток больных. Однако уже в эти годы обратили внимание на зависимость чувствительности и специфичности РПГА от используемого для сенсибилизации Аг [15]. Большой вклад в разработку этой проблемы внесли отечественные исследователи. Ими в эти годы были получены для применения в РПГА цельноклеточный мелиоидозный Аг [Лозовой Н.В. и др., 1964], фракции этого Аг, выделенные высаливанием в сульфате аммония и

препаративным электрофорезом [8]. Весомый вклад в изучение этих проблем внесли Пивень Н.Н. и др., которые, изучив сыворотки зараженных мелиоидозом животных, показали, что синтез специфических Аг происходит на Аг b и Аг d из состава цельноклеточного мелиоидозного Аг [5]. В связи с отсутствием в Российской Федерации сывороток людей, больных мелиоидозом и сапом, изучение зависимости чувствительности и специфичности тест-систем для диагностики этих инфекций у людей на основе РПГА и ТИФА не проводилось.

Первое исследование использования РПГА с оценкой чувствительности и специфичности для диагностики мелиоидоза у людей выполнили американские ученые из военного медицинского центра в Вашингтоне в 1970 г. [9]. В этой работе Alexander A.D. et al. использовали три штамма *B.pseudomallei* (один из китайской коллекции, два изолированы от больных американских солдат из Вьетнама и Бирмы). Аг получали по методике Rise C.E. et al.: безбелковую жидкую среду, в которой выращивали бактерии в течение 2 недель при 37°C, стерилизовали нагреванием, фильтровали и концентрировали пятикратно испарением [28]. Было установлено, что при сенсибилизации эритроцитов Аг каждого штамма, смесью Аг двух и смесью Аг трех штаммов параметры РПГА не изменялись. В дальнейшем в исследовании в качестве сенсибилизирующего Аг использовали смесь Аг трех штаммов. Для оценки операционных характеристик тест-системы на основе РПГА тестировали 402 сыворотки от 112 больных мелиоидозом, 122 сыворотки больных другими инфекциями. Чувствительность тест-системы при диагностике мелиоидоза оказалась равной 95,53%, специфичность — 91,2%. Высокие значения операционных параметров тест-системы указывали на ее эффективность, что и позволило авторам сделать вывод о ценности РПГА в качестве инструмента для диагностики мелиоидоза у человека.

В 70-х годах прошлого века, был разработан для выявления и количественного определения Аг и Ат простой и чувствительный метод — твердофазный иммуоферментный анализ [18]. Этот метод вскоре был применен для диагностики мелиоидоза. Практически сразу же начались поиски Аг, который обеспечил бы наибольшие чувствительность и специфичность теста. РПГА с Аг, полученным по методике Rise C.E. et al., в этих работах чаще применялась для сравнения с ТИФА [28].

В 1989 г. Ashdown L.R. et al. сообщили о результатах сравнительного анализа применения ТИФА с выявлением IgG и IgM и традиционного РПГА при диагностике различных форм мелиоидоза [11]. В ТИФА использовали смесь клеточных Аг 8 штаммов *B.pseudomallei*. Аг получали из бактериальной массы, выращенной на триптиказо-соевом агаре в течение 24 часов при 35°C, стерилизованной прогреванием и обработанной ультразвуком. Для оценки тест-систем на основе ТИФА и РПГА были взяты 140 сывороток больных мелиоидозом и 149 сывороток больных другими болезнями. Чувствительность ТИФА с выявлением IgG при острой фазе мелиоидоза составила 93%, при конвалесцентной фазе — 95%, специфичность — 96%. При этом, чувствительность РПГА при выявлении этих же Ат в острой фазе составила 85%, в конвалесцентной фазе — 92%, специфичность — 100%. Авторы сделали вывод, что метод ТИФА быстр, надежен, достаточно прост и доступен.

В это же время, в целях получения тест-систем с 100% чувствительностью и 100% специфичностью, что является необходимым при диагностике острой формы мелиоидоза, которая приводит к летальному исходу в течение 48 часов после заражения [Chaowagul W. et al., 1989], использовали одновременно оба

метода — ТИФА и РПГА с выявлением IgG и IgM [21]. В ТИФА применяли клеточные Ag *B.pseudomallei*, выделенные из бактериальной массы суточной культуры на кровяном агаре, обработанной ультразвуком. В РПГА использовали Ag, полученные по методике Rise C.E. et al. [28]. Было установлено, что ТИФА с обнаружением IgM диагностирует мелиоидоз в острой форме. РПГА эффективнее обнаруживал Ат к Ag *B.pseudomallei* при хронической форме болезни. Комбинация ТИФА и РПГА обеспечивала, по мнению авторов, самую точную диагностику мелиоидоза. В этой работе для выявления более эффективной тест-системы был использован анализ операционной характеристической кривой, известный как ROC-анализ, изначально разработанный для анализа изображений на экранах радиолокационных станций и позже адаптированный для оценки чувствительности и специфичности диагностических тестов, в том числе тестов для диагностики мелиоидоза у животных и человека на основе РПГА и ТИФА [1, 21, 23].

Эндотоксин (липополисахарид) стал следующим Ag, который использовали в ТИФА для диагностики мелиоидоза Petkanjanapong V. et al. [25]. Ag выделяли из лизата бактериальной массы 5 штаммов *B.pseudomallei*, выращенной в течение 4 суток на твердой питательной среде, используя водно-фенольный метод по Вестфалу [34]. Для оценки иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза с эндотоксином и тест-системы на основе РПГА использовали 47 сывороток больных мелиоидозом, 55 сывороток больных другими инфекциями. Чувствительность и специфичность ТИФА составили 95,7% и 94,2% соответственно. Чувствительность, специфичность РПГА имели значения соответственно 81,0% и 91,4%, что ниже значений аналогичных параметров ТИФА: Применив ROC-анализ, авторы сравнили полученные значения операционных характеристик ТИФА и РПГА при диагностике мелиоидоза и установили, что более эффективной оказался ТИФА [25].

Важным шагом в изучении зависимости операционных характеристик иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза от используемого Ag стала работа Anuntagool N. et al. [11]. Авторами были получены и протестированы 5 иммуноферментных тест-систем с Ag, выделенными из бактериальной массы штамма *B. pseudomallei*, выращенной на кровяном агаре и стерилизованной кипячением. Это были: грубый экстракт — полный набор клеточных Ag; вероналовый экстракт — выделенный из грубого экстракта; две иммуногенные фракции 19,5 kDa и 39,0 kDa, элюированные из ПААГ после электрофореза грубого экстракта; Ag, выделенный из грубого экстракта аффинной хроматографией на Sepharose 4B с моноклональным Ат, специфичным Ag *B. pseudomallei*. Для оценки этих тест-систем использовали 37 сывороток больных септическим мелиоидозом, 25 сывороток больных другими болезнями. Наибольшая специфичность (94%) была достигнута при использовании в ТИФА аффинно очищенного Ag, чувствительность при этом составляла 81%. Однако наиболее эффективной оказалась ТИФА с очищенным 19,5 kDa Ag: чувствительность составляла 92%, специфичность — 91%. При этом фракция 19 kDa была выявлена на иммуноэлектрофореграмме *B.cerasia*, что уменьшило значение специфичности этой тест-системы. Авторы сочли этот факт не столь важным, так как инфекции, вызванные *B.cerasia*, в их регионе встречаются редко [11].

Поиск оптимального Ag, получаемого лизисным путем, продолжили Phung L.V. et al., которые в 1995 году использовали в качестве сенсibiliзирующего Ag для ТИФА очищенный гликолипид штамма *B.pseudomallei* [26]. Этот вариант ТИФА выявлял IgG к Ag *B.pseudomallei* в сыворотках больных мелиоидозом

зом с чувствительностью 98% и специфичностью 98,9%. Совместное применение ТИФА и РПГА обеспечивало обнаружение иммуноглобулинов с чувствительностью 100% и специфичностью 97,8%.

В том же году Rugdech P. et al. охарактеризовали выделенный с помощью аффинной хроматографии поверхностный Ag *B.pseudomallei* с молекулярной массой 200 kDa [29]. Было показано, что ТИФА с этим Ag эффективен для обнаружения IgG к Ag *B.pseudomallei*. Следует отметить исследование, в котором Dharakul T. et al. выяснили, что применение ТИФА с аффинно очищенным 200 kDa Ag позволяло ускоренно обнаружить в сыворотках больных мелиоидозом IgG и IgM к Ag *B. pseudomallei* с чувствительностью 85,7% и 63,7% и со специфичностью 82,5% и 81,8% соответственно [17]. Параметры этой тест-системы были выше, чем параметры РПГА, которая выявляла Ag к Ag *B. pseudomallei* в сыворотках больных с чувствительностью равной 71% и специфичностью — 74,7%. Вариант ТИФА с 200 kDa Ag и с обнаружением IgG позволил диагностировать септический мелиоидоз и его локализованные формы с чувствительностью 87,8% и 82,6% соответственно. Авторы рекомендовали применять этот вариант ТИФА для диагностики мелиоидоза в эндемичных областях.

Sirisinha S. et al. в 2000 г. провели сравнительный анализ пяти методов диагностики мелиоидоза, использующихся в практической медицине в Таиланде: бактериологический, иммунохроматографический, ТИФА, РПГА, иммуноблоттинг [31]. В ТИФА применяли Ag *B.pseudomallei*: аффинно очищенный 200 kDa компонент клеточных Ag; ЛПС; культуральный фильтрат (основной компонент — протеин 30 kDa). В РПГА использовали ЛПС, фенольно-водный экстракт по Вестфалю [34] и мелиоидин, полученный по методике Rise C.E. et al. [28]. Для оценки чувствительности и специфичности тест-систем использовали 57 сывороток больных мелиоидозом и 44 сыворотки больных другими инфекциями. Максимальной чувствительностью обладал РПГА с мелиоидином — 93%. Однако специфичность при этом была минимальной — 34%. Наиболее эффективной оказалась ТИФА с культуральным фильтратом, выявляющая IgG с чувствительностью 82% и специфичностью 80%. Основываясь на этих результатах, авторы сделали вывод: бактериологический метод, несмотря на новые технологии и недостатки (длительное время постановки окончательного диагноза — до 4 суток), остается методом выбора из-за своей надежности, простоты и низкой стоимости. Для ускорения диагностики авторы предложили использовать комбинацию методов: бактериологического (в течение 18 часов микроорганизмы выращивать на питательной среде) и ПЦР или одного из иммунологических методов для установки окончательного диагноза. Такой вариант тестов ускорял постановку диагноза с 3 — 4 дней до 18 — 36 часов [31].

В другом исследовании Chenthamarakshan V. et al. выявляли IgG и IgM к Ag *B.pseudomallei*, предложенной ими ТИФА с Ag — фильтратом бульонной культуры возбудителя мелиоидоза [16]. В работе использовали 95 сывороток больных мелиоидозом, 225 сывороток больных другими инфекциями. Авторы установили, что чувствительность и специфичность ТИФА с выявлением IgG составили 96% и 94%. ТИФА с выявлением IgM — 74% и 99% соответственно. Авторы сделали вывод: обнаружение IgG — лучший индикатор болезни мелиоидозом.

Спустя 6 лет Chantratita N. et al. сообщили о результатах изучения диагностики мелиоидоза в Таиланде с применением 5 вариантов ТИФА, в которых использовались 5 различных Ag штаммов *B.pseudomallei* K96243 и *B.thailand*

densis E32: грубый экстракт из бактериальной массы штаммов, липополисахарид (LPS) и экзополисахарид (EPS), выделенные фенольно-хлороформным методом и аффинно очищенный Ag [13, 29, 34]. Для сравнения применяли РПГА с Ag по Rise C.E. et al. [28]. Тестировали 120 сывороток больных мелиоидозом, 202 сыворотки больных другими инфекциями. Наибольшая чувствительность была показана в ТИФА с аффинно очищенным Ag (82%), а наибольшая специфичность — в ТИФА с ЭПС — 81%. РПГА выявлял IgG с чувствительностью равной 73%, специфичностью — 64%. Авторы сделали вывод, что диагностика мелиоидоза ТИФА значительно совершеннее диагностики РПГА.

Таким образом, к настоящему времени изучено применение тест-систем для диагностики мелиоидоза на основе РПГА и ТИФА с лизатными Ag *V. pseudomallei*: фильтратом жидкой культуры, эндотоксином, цельноклеточными Ag, ЭПС, ЛПС, очищенным гликолипидом, аффинно очищенными Ag, белковыми Ag с молекулярной массой 19,5 и 39 kDa. Выявлены наиболее эффективные тест-системы.

В начале XXI века публикуются первые сообщения об изучении применения в ТИФА для диагностики мелиоидоза в качестве Ag рекомбинантных белков. Эти авторы считают, что их применение не только повысит чувствительность и специфичность тест-систем, но сделает работу персонала в лабораториях более безопасной от заражения [14].

В 2003 г. Chen Y.-S. et al. сообщили о получении двух рекомбинантных белков: аналога флагеллина (состоит из 387 аминокислот) и укороченного на 80 аминокислот варианта этого белка и создании на их основе иммуноферментной тест-системы для диагностики мелиоидоза [14]. Ранее ими было установлено, что аминокислотная последовательность белка флагеллина имеет гомологию 33—46% с аналогичными последовательностями *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* и др. В то же время, и N- и C-концевые аминокислотные последовательности (аминокислоты 1—40 и 300—387) имеют гомологию 50—67% с аналогичными последовательностями вышеназванных бактерий. Авторы получили ДНК укороченного варианта гена флагеллина без фрагментов ДНК, соответствующих названному концевым аминокислотным последовательностям. Затем были получены и очищены протеины — аналог флагеллина и его укороченный вариант, которые и были использованы в ТИФА для диагностики мелиоидоза. Для оценки операционных характеристик этих тест-систем тестировали 32 сыворотки больных септическим мелиоидозом (16 больных), 100 сывороток больных другими инфекциями. Наибольшей чувствительностью (93,8%) и специфичностью (96,3%) обладала иммуноферментная тест-система с укороченным флагеллином, которую авторы рекомендовали применять для диагностики мелиоидоза в Тайване.

Тремя годами позже Allwood E.M. et al. сообщили о получении трех рекомбинантных протеинов (BPSL0972, BipD и OprA), аналогов соответствующих белков штамма *V. pseudomallei* K96243, и создании на их основе иммуноферментных тест-систем для диагностики мелиоидоза [10]. Для оценки операционных характеристик этих тест-систем тестировали 74 сыворотки больных мелиоидозом и 20 сывороток больных другими инфекционными болезнями. Было установлено, что из полученных трех тест-систем ТИФА с OprA диагностирует мелиоидоз с наибольшими чувствительностью (95%) и специфичностью (98%). Авторы сделали вывод, что белок OprA оптимальный Ag для иммуноферментных тест-систем, создаваемых для диагностики мелиоидоза.

Следует отметить современное исследование, в котором Puah S.M. et al. выделили 6 рекомбинантных белков и применили их в ТИФА для диагностики мелиоидоза [27]. На первом этапе, используя 4 штамма *V.pseudomallei* и систему NovaTopeSystem (Novagen, USA), авторы получили геномную библиотеку: набор фрагментов ДНК размером 50 — 200 bp. Затем получили набор рекомбинантных полипептидов с молекулярными массами 46 — 48 kDa, из которых по результатам тестирования на иммуногенность в иммуноблоттинге с иммунными сыворотками к Ag *V.pseudomallei* были отобраны, очищены и идентифицированы 6 иммуногенных полипептидов. Для оценки операционных характеристик иммуноферментных тест-систем с полученными 6 Ag тестировали 60 сывороток больных мелиоидозом, 60 сывороток больных другими инфекциями.

Результаты показали, что наибольшими значениями операционных характеристик обладали тест-системы с протеинами BPSS1904 (чувствительность 78,9%, специфичность 79,4%) и BPSL3130 (чувствительность 79,4%, специфичность 94,8%). Авторы сделали вывод: пептиды BPSS1904 и BPSL3130 являются оптимальными Ag для сенсibilизации пластин в ТИФА при диагностике мелиоидоза. Недостаточную же чувствительность предлагаемых тест-систем рекомендовалось компенсировать использованием комбинации двух рекомбинантных Ag или рекомбинантного и лизатного [27].

Рассмотренные исследования в большей степени касались создания тест-систем для диагностики мелиоидоза. В последние годы были опубликованы результаты работ по разработке иммуноферментных тест-систем для диагностики сапа и дифференциации его от мелиоидоза. Так, Kumar S. et al. в 2011 г. сообщили об изучении применения полученного рекомбинантного белка gVimA в тест-системе для диагностики сапа [20]. В процессе получения часть из vimA гена была амплифицирована PCR, клонирована в pET векторе и экспрессирована в *Escherichia coli*. Иммуногенность очищенного протеина gVimA с молекулярной массой 12,2 kDa установлена в иммуноблоттинге с His-моноклональным Ag. Тестирование 21 сыворотки больных лошадей и 10 сывороток больных людей методом ТИФА с белком gVimA позволило диагностировать сап с чувствительностью равной 100%. Для оценки специфичности полученной тест-системы с белком gVimA использовали 1524 сыворотки лошадей, больных другими инфекциями. Специфичность составила 98,88%. При этом, тестирование этой тест-системой 10 сывороток людей, больных мелиоидозом, не выявило перекрестных реакций. Авторы, охарактеризовав иммуноферментную тест-систему с gVimA как простую, чувствительную и специфичную при диагностике сапа, рекомендовали ее для применения в эндемичных районах. В 2012 г. Pal V. et al. сообщили о результатах дальнейшей работы по поиску рекомбинантных протеинов — аналогов иммуногенных белков *V.mallei* [24]. Для этого были сравнены с помощью программы BLAST около 3000 генов (секвенированных последовательностей штамма *V. mallei* NTCC 10229), сиквенсов штаммов *V. pseudomallei*, *V.thailandensis* и др. бактерий, взятых из Pathema-Burkholderia Bioinformatics Resource Center (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Burkholderia/PathemaHomePage.cgi>). В результате этого анализа были отобраны для оценки возможности использования при создании специфичных диагностических препаратов три гена штамма *V.mallei* NCTC 10229: VMA10229_0375, VMA10229_0376, VMA10229_A3050. Они были представлены во всех штаммах *V.mallei* и отсутствовали в большинстве штаммов *V.pseudomallei* и *V.thailandensis* и других бактерий. Затем были экспрессированы, очищены и

тестированы на иммуногенность в иммуноблоттинге с His-моноклональным антителом 4 рекомбинантных белка с молекулярными массами 18, 10, 17, 22 kDa, соответствующие этим генам. Операционные характеристики тест-систем ТИФА, использующих эти протеины в качестве Аг, оценивали, тестируя 21 сыворотку больных мелиоидозом лошадей и 102 сыворотки лошадей, больных другими инфекциями. Было установлено, что ТИФА с белками 0375Н, 0375ТН выявлял Аг к *Ag V. mallei* со 100% чувствительностью и 100% специфичностью. Тест-системы ТИФА с рекомбинантными белками 0376ТН и А3050Н имели более низкие чувствительность (71,4% и 80,9%) и специфичность (96% и 92%). Авторы, протестировав 10 сывороток людей, больных мелиоидозом, доказали способность тест-системы ТИФА с белками 0375Н и 0375ТН дифференцировать заболевания людей мелиоидозом и сапом. Эти публикации позволяют сделать вывод о высокой эффективности тест-систем ТИФА с рекомбинантными белками для диагностики мелиоидоза и сапа.

В рассмотренных сообщениях представлены сконструированные тест-системы для диагностики сапа и мелиоидоза на основе РПГА и ТИФА как с лизатными, так и с рекомбинантными Аг, разработанные методики и результаты тестирования их на чувствительность и специфичность. Большинство авторов отмечали эффективность предлагаемых ими тест-систем для диагностики мелиоидоза и сапа. Однако в настоящее время определить самую эффективную тест-систему затруднительно, так как результаты этих исследований сложно сравнить из-за отсутствия требований к количеству тестируемых сывороток больных мелиоидозом и сапом при расчете чувствительности и требований к количеству сывороток больных другими инфекционными болезнями при расчете специфичности. Ряд авторов, отмечая, что поиск Аг до настоящего времени носит случайный характер, призывают к скорейшему переходу к выбору Аг через изучение свойств пептидов, структуры и функций антигенных эпитопов [27, 31]. Все это предопределяет такое положение с тест-системами для диагностики мелиоидоза, которое отметили Puah S.M. et al.: отсутствие известного универсального Аг *V. pseudomallei* делает серологический диагноз мелиоидоза трудным и спорным [27]. Аналогичное положение и с тест-системами для диагностики сапа. А это значит, что требуется дальнейшая работа по поиску таких универсальных Аг. Нельзя не отметить на основании последних публикаций, что все-таки более эффективны тест-системы с рекомбинантными протеинами в качестве Аг. Однако дороговизна препаративного выделения этих Аг ограничивает их применение. Следовательно, какие Аг в итоге станут основными в тест-системах ТИФА и РПГА для диагностики мелиоидоза и сапа, используемых в районах, эндемичных по этим инфекциям, еще далеко не определено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Будченко А.А., Мазурова И.Ю., Илюхин В.И., Храпова Н.П. ROC-анализ результатов выявления антигенов возбудителей мелиоидоза и сапа твердофазным иммуноферментным методом. Проблемы особо опасных инфекций. 2013, 2: 37-41.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., Высшая школа. 1991.
3. Илюхин В.И., Сенина Т.В. Мелиоидоз: итоги столетнего изучения, современные проблемы и зримые перспективы. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012, 5: 41-46.
4. Кэйти Д. (ред.) Антитела. Методы. М., Мир. 1991.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Замарин А.Е., Алексеев В.В., Васильев В.П. Адекватный

выбор антигенов при серодиагностике экспериментального мелиоидоза. Журн. микробиол. 2007, 2: 49-53.

6. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03», утв. 12.03.2003.
7. Тихонов Н.Г., Липницкий А.В., Илюхин В.И. История открытия и изучения возбудителя сапа. В: Тихонов Н.Г. (ред.) Сап. Сборник научных трудов. Волгоград, Нижневолжское книжное, 1995, с. 4-6.
8. Ширяев Д.Т., Рассудов С.М., Гольдберг А.М., Лозовой Н.В., Родионова А.В. Эритроцитарные диагностикумы в реакции пассивной гемагглютинации при мелиоидозе и сапе. В: Диагностика особо опасных инфекций. Ростов Н/Д, 1968: 42-47.
9. Alexander A.D., Huxsoll D.L., Warner A.R. et al. Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement. *Appl. Microbiol.* 1970, 20: 825-833.
10. Allwood E.M., Logue C.-A., Hafner G.J. et al. Evaluation of recombinant antigens for diagnosis of melioidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008, 54: 144-153.
11. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. *J. Clinical Microbiol.* 1993, 31: 1232-1236.
12. Chambon L., Fournier J., Lajudie P. et al. La reaction d'hémagglutination dans la melioidose. *Ann. Inst. Pasteur.* 1953, 85 (4): 530-534.
13. Chantratita N., Wuthiekanun V., Thanwisai A. et al. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using crude and purified antigens for serodiagnosis of melioidosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007, 14: 110-113.
14. Chen Y.-S., Shiuan D., Chen S.-C. et al. Recombinant truncated flagellin of *Burkholderia pseudomallei* as a molecular probe for diagnosis of melioidosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003, 10: 423-425.
15. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18 (2): 383-416.
16. Chenthamarakshan V., Vadivelu J., Puthuchery S.D. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001, 39 (1): 1-7.
17. Dharakul T., Songsivilai S., Anuntagool N. et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, 56: 418-423.
18. Engvall E., Perlmann G. P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971, 8 (9): 871-874.
19. Ileri S.Z. The indirect haemagglutination test in the diagnosis of melioidosis in goats. *Br. Vet. J.* 1965, 121: 164-170.
20. Kumar S., Malik P., Kumar Verma S. et al. Use of a recombinant *Burkholderia intracellular motility A* protein for immunodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011, 18: 1456-1461.
21. Kunakorn M., Boonma P., Khupulsup K. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28: 1249-1253.
22. Laws L. Melioidosis in animals in North Queensland. Serological methods for the diagnosis in goats, pigs, cattle, horses and man. *Queensland J. Agric. Sci.* 1967, 24 (2): 223-234.
23. Limmathurotsakul D., Chantratita N., Teerawattanasook N. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of melioidosis: better than we thought. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 52: 1024-1028.
24. Pal V., Kumar S., Malik P. et al. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19: 1193-1198.
25. Petkanjanapong V., Naigowit P., Kondo T. et al. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 1992, 10 (2): 145-150.
26. Phung L.V., Han Y., Oka S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a glycolipid antigen for the serodiagnosis of melioidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995, 12 (3-4): 259-264.
27. Puah S.M., Puthuchery S.D., Chua K.N. Potential immunogenic polypeptides of *Burkholderia pseudomallei* identified by shotgun expression library and evaluation of their efficacy for serodiagnosis of melioidosis. *Int. J. Med. Sci.* 2013, 10 (5): 539-547.

28. Rice C.E., Konst H., Duthie R.C. Studies by complement-fixation methods of malleins produced in broth and synthetic media. I. Relative immunizing activities in horses and rabbits copyright and license information. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 1951, 15 (12): 284-291.
29. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* March. 1995, 52: 231-235.
30. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N. et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000, 63: 146-149.
31. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. *Acta Tropica.* 2000, 74: 235-245.
32. Strauss A., Alexander A.D., Rapmaund G. Melioidosis in Malaysia. Antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* in human population. 1969, 18 (1): 703-707.
33. Tiyawisutsri R., Peacock S.J., Langa S. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43: 4872-4874.
34. Westphal O., Jan K. Bacterial lipopolysaccharides; extraction with phenol-water and further applications of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965, 5: 83-91.
35. Wheelis M. First shots fired in biological warfare. *Nature.* 1998, 395: 213.

Поступила 2002.16

Контактная информация: Будченко Анатолий Александрович, к.б.н.,
400087, Волгоград, ул. Голубинская 7, р.т. (8442)36-37-43

© А.Л.КРАВЦОВ, 2016

А.Л.Кравцов

РОЛЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ПРИ ОСОБО ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Приводятся новые сведения о нейтрофильных внеклеточных ловушках (НВЛ), осуществляющих захват и киллинг патогенных микроорганизмов с большей эффективностью, чем при фагоцитозе. Представлен современный взгляд на то, каким образом нейтрофилы выбирают внутриклеточный (фагоцитоз) или внеклеточный (нетоз) механизм бактерицидности при взаимодействии с патогенными микроорганизмами. Проанализированы экспериментальные данные о наличии у возбудителей чумы, холеры и мелиоидоза механизмов защиты от бактерицидного эффекта НВЛ, а также о роли НВЛ в регуляции иммунного ответа и развитии сепсиса.

Журн. микробиол., 2016, № 4, С. 95—104

Ключевые слова: нейтрофильные внеклеточные ловушки, чума, сибирская язва, холера, мелиоидоз

A.L.Kravtsov

ROLE OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS IN ESPECIALLY DANGEROUS BACTERIAL INFECTIONS

Russian Research Institute of Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Novel data on neutrophil extracellular traps (NET), carrying out capture and killing of pathogenic microorganisms with higher effectiveness than during phagocytosis, are presented. A contemporary view on how neutrophils choose intracellular (phagocytosis) or extracellular