

Сергей Владимирович Иващенко^{1✉}, Виктор Эммануэль Маниесон²,
Ксения Александровна Петченко³, Татьяна Владиславовна Спирихина⁴,
Ольга Сергеевна Ларионова⁵

^{1,2,3,4,5}Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, Россия

¹ivashenko-sv@mail.ru

²zusket5050@gmail.com

³petchenko.ksyha@gmail.com

⁴69tan69@mail.ru

⁵larionova1@mail.ru

ПОЛУЧЕНИЕ И КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК К АНТИГЕНУ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННОМУ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДА

Цель исследования – получение гипериммунных сывороток крови морской свинки и кролика с использованием антигена, выделенного при помощи диметилсульфоксида из клеток *Yersinia pseudotuberculosis*, а также изучение возможности комплексного использования полученных специфических антител в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) для обнаружения иерсиний. Для получения гипериммунных сывороток использовали смесь антигена и адъюванта в соотношении 1:1. В составе антигена преобладали белки. Его вводили животным в количестве 0,6 мг на морскую свинку и 2 мг на кролика. В качестве адъюванта применяли 1 %-й полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода. Иммунизировали животных подкожно пятикратно с интервалом в 2 недели. Полученные сыворотки проявили в ИФА родовую специфичность по отношению к *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* (1:6400–1:25600). Взаимодействие их с *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Brucella abortus* было незначительным (1:100–1:400). Комплексное использование специфических гипериммунных сывороток крови от двух видов животных позволило провести непрямой ИФА для обнаружения антигена. Для этого адсорбировали антитела морской свинки на поверхности лунок микропланшета. Затем с помощью кроличьей сыворотки осуществили индикацию антигена, прикрепившегося к адсорбированным на микропланшете антителам морской свинки. Антитела кролика выявляли пероксидазным антивидовым конъюгатом. Комплексное использование экспериментальных сывороток позволило обнаружить энтеропатогенные иерсинии в среде накопления даже в условиях значительного фекального загрязнения исследуемого материала уже на 3-й день «холодового обогащения» при условии внесении в 1 мл среды накопления не менее 50 иерсиниозных клеток.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, гипериммунная сыворотка, антиген, диметилсульфоксид, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Получение и комплексная оценка диагностических сывороток к антигену *Yersinia pseudotuberculosis*, выделенному с применением диметилсульфоксида / С.В. Иващенко [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 1. С. 125–130. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-1-125-130.

Sergey Vladimirovich Ivashchenko^{1✉}, Victor Emmanuel Manieson²,
Ksenia Aleksandrovna Petchenko³, Tatyana Vladislavovna Spiriyakhina⁴,
Olga Sergeevna Larionova⁵

^{1,2,3,4,5}Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russia

¹ivashchenko-sv@mail.ru

²zusket5050@gmail.com

³petchenko.ksyha@gmail.com

⁴69tan69@mail.ru

⁵larionova1@mail.ru

OBTAINING AND COMPREHENSIVE EVALUATION OF DIAGNOSTIC SERUM TO *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* ANTIGEN, ISOLATED USING DIMETHYL SULPHOXIDE

The aim of the study is to obtain hyperimmune blood sera of guinea pig and rabbit using an antigen isolated from *Yersinia pseudotuberculosis* cells using dimethyl sulfoxide, as well as to study the possibility of complex use of the obtained specific antibodies in indirect enzyme immunoassay (ELISA) for the detection of *Yersinia*. To obtain hyperimmune sera, a mixture of antigen and adjuvant was used in a ratio of 1:1. Proteins predominated in the composition of the antigen. It was administered to animals in the amount of 0.6 mg per guinea pig and 2 mg per rabbit. 1 % polyazolidinammonium modified with iodine hydrate ions was used as an adjuvant. Animals were immunized subcutaneously five times with an interval of 2 weeks. The resulting sera showed generic specificity in ELISA against *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* (1:6400–1:25600). Their interaction with *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*, *Brucella abortus* was insignificant (1:100–1:400). The complex use of specific hyperimmune blood sera from two animal species made it possible to conduct indirect ELISA for antigen detection. To do this, we adsorbed guinea pig antibodies on the surface of microplate wells. Then, with the help of rabbit serum, an indication of the antigen attached to the guinea pig antibodies adsorbed on the microplate was carried out. Rabbit antibodies were detected with a peroxidase antispecies conjugate. The complex use of experimental sera made it possible to detect enteropathogenic *Yersinia* in the accumulation medium even under conditions of significant fecal contamination of the test material already on the 3rd day of "cold enrichment", provided that at least 50 *Yersinia* cells were added to 1 ml of the accumulation medium.

Keywords: *Yersinia pseudotuberculosis*, hyperimmune serum, antigen, dimethyl sulfoxide, enzyme immunoassay

For citation: Obtaining and comprehensive evaluation of diagnostic serum to *Yersinia pseudotuberculosis* antigen, isolated using dimethyl sulfoxide / S.V. Ivashchenko [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(1): 125–130. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-1-125-130.

Введение. Энтеропатогенные иерсинии (*Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis*) повсеместно вызывают расстройства функции желудочно-кишечного тракта у молодняка сельскохозяйственных животных. Эти расстройства известны как кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулез.

Основным методом диагностики иерсиниозов является бактериологический, в котором ключевое значение имеет «холодовое обогащение» возбудителя на бедных питательных средах накопления [1].

Эффективность бактериологической диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза можно повысить предварительной индикацией иерсиний в средах накопления при помощи иммуноферментной тест-системы. Обязательной составной частью тест-системы являются гипериммунные сыворотки, содержащие специфические антитела. Для непрямого варианта ИФА необходимо наличие иерсиниозных сывороток, полученных от двух видов лабораторных животных [2]. Нами ранее была получена иерсиниозная гипериммунная сыворотка от

кроликов [3]. В настоящей работе предпринята попытка использования морских свинок для получения антител.

Для иммунизации животных нами использовался антиген (ДА), полученный в результате обработки клеток *Y. pseudotuberculosis* диметилсульфоксидом. Основной химический состав ДА представлен белками [4].

Получение иммунных сывороток с высоким титром антител возможно только при использовании адъювантов, усиливающих действие антигена. Синтетические полиэлектролиты являются перспективной группой адъювантных препаратов [5]. Представителем данной группы химических соединений является полиазолидинаммоний, модифицированный гидрат-ионами йода (ПААГ).

Возможности совместного применения ПААГ и ДА *Y. pseudotuberculosis* для получения гипериммунных сывороток крови впервые изучались нами при иммунизации кроликов [3]. Данный эксперимент показал перспективность таких гипериммунизаций, что определило использование комплекса ПААГ + ДА *Y. pseudotuberculosis* при иммунизации морских свинок.

Цель исследования – получение гипериммунной сыворотки крови морской свинки путем иммунизации животного ДА *Y. Pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ, а также изучение возможности комплексного использования полученных антител с аналогичными кроличьими антителами в непрямом ИФА.

Задачи: получение гипериммунной сыворотки крови морской свинки в результате иммунизации животного ДА *Y. pseudotuberculosis* и ПААГ в качестве адъюванта; изучение специфичности полученной гипериммунной сыворотки крови морской свинки; совместное использование полученных антител с аналогичными кроличьими антителами в непрямом ИФА для индикации иерсиний в среде накопления с фекалиями свиней.

Объекты и методы. ДА получали из микробной культуры *Y. pseudotuberculosis* III O:3 сероварианта. Специфичность гипериммунных сывороток крови морских свинок определяли при помощи формализированных клеток *Y. Pseudotuberculosis* O:1, O:3, O:4, O:5 серовариантов, *Y. enterocolitica* O:3, O:9 серовариантов и других видов бактерий кишечной группы, а также единого бруцеллезного антигена производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов». Все исполь-

зованные в работе штаммы бактерий были получены из музейной коллекции патогенных микроорганизмов ФКУН РосНИПЧИ «Микроб».

Методика получения ДА *Y. Pseudotuberculosis* заключалась в обработке сухой ацетоновой микробной массы бактерий диметилсульфоксидом. «Ацетоновый порошок» заливали диметилсульфоксидом в соотношении 1:6, инкубировали на шейкере при 37 °С 40 мин, осаждали центрифугированием при 5 тыс. об/мин и удаляли осадок. Надосадочную жидкость, содержащую ДА, диализировали против 0,01 М карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (КББ) для освобождения от диметилсульфоксида. Диализ проводили 10 ч при комнатной температуре, с перемешиванием и сменой КББ. Полученный ДА лиофильно высушивали [4].

Иммунизацию морских свинок массой 400–500 г проводили подкожно четырехкратно вдоль спины в 3–4 точки в объеме 1 мл смеси ДА и ПААГ. Соотношение адъюванта к раствору антигена составляло 1:1. ПААГ использовали в 1 %-й концентрации. ДА вводили из расчета 0,6 мг препарата на животное. Иммунизирующая доза для морской свинки была рассчитана из дозы, использованной нами ранее для иммунизации кролика, с учетом коэффициента межвидового переноса доз [6]. Было проведено 5 иммунизаций с интервалом в 2 недели. Кровь для получения сыворотки брали из сердца в процессе тотального обескровливания животного через 14 сут после последней иммунизации.

Гипериммунная сыворотка крови кролика была получена нами ранее аналогичным способом при введении 2 мг ДА на животное [3].

Полученные гипериммунные сыворотки крови морских свинок исследовали методом твердофазного непрямого ИФА [7].

10 %-ю взвесь свиных фекалий, отобранных в момент дефекации, обсеменяли суточными агаровыми культурами *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis*, а затем вносили в среду накопления (фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH = 7,6–7,8) таким образом, чтобы концентрации иерсиний в средах накопления составляли $5 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^3$; 50; 5 клеток/мл. Среда накопления с посевами инкубировали при 4 °С в течение 6 сут. Исследование сред в ИФА проводили на 3-и и 6-е сут «холодового обогащения» посевов. Для индикации иерсиний часть содержимого

пробирки после перемешивания среды вносили в лунку планшета и обрабатывали 1 %-м формалином в течение 4 ч.

Результаты и их обсуждение. Результаты оценки специфичности гипериммунных сывороток представлены в таблице 1. Полученная гипериммунная сыворотка морской свинки показала родовую иерсиниозную специфичность в

ИФА с цельными клетками бактерий. Взаимодействие с бактериями из других родов кишечной микрофлоры и бруцеллами было незначительным. Гипериммунная сыворотка крови морской свинки проявила несколько меньшую антигеновую активность и сходную специфичность при сравнении с аналогичной кроличьей сывороткой (табл. 1).

Таблица 1

Результат определения специфичности полученных гипериммунных сывороток крови

Бактериальные клетки в разведении 10^9 на 1 мл	Титры антител полученных сывороток в ИФА с клетками бактерий	
	Сыворотка морской свинки	Сыворотка кролика
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:1	1:12800	1:25600
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:3	1:12800	1:25600
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:4	1:6400	1:12800
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> O:5	1:12800	1:12800
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	1:12800	1:25600
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	1:6400	1:12800
<i>Escherichia coli</i>	1:200	1:400
<i>Salmonella typhimurium</i>	1:100	1:100
<i>Proteus vulgaris</i>	1:100	1:200
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1:200	1:200
<i>Brucella abortus</i>	1:100	1:200

Для определения антигенов в исследуемом материале могут быть использованы прямой и непрямой варианты ИФА. Для проведения прямого ИФА диагностическую сыворотку необходимо конъюгировать с ферментом, что может привести к снижению чувствительности и специфичности создаваемой тест-системы. В непрямом варианте ИФА конъюгировать специфическую сыворотку не надо, поэтому непрямой вариант ИФА был признан более перспективным. Для его осуществления мы имели две специфические гипериммунные сыворотки: морской свинки и кролика. Антитела морской свинки было решено использовать для адсорбции на поверхности лунок планшета в разведении 1:200, а с помощью кроличьих антител мы осуществляли индикацию антигена в исследуемом материале, также используя разведения 1:200. Последовательность этапов проведения прямого ИФА приведена на рисунке.

Исследуемым материалом для индикации являлась среда накопления – ФСБ, предварительно обсемененная энтеропатогенными иерсиниями и фекалиями свиней, а также подвергнутая «холодовому обогащению». Проведенная подготовка исследуемого материала позволила максимально приблизить процесс индикации к реальной ситуации, при которой наблюдается присутствие значительного количества посторонней микрофлоры и накопление корпускулярных и растворимых иерсиниозных антигенов. Результаты исследования указывают на возможность индикации энтеропатогенных иерсиний при помощи экспериментальных сывороток на 3-й день «холодового обогащения» при условии внесения в 1 мл среды накопления не менее 50 иерсиниозных клеток, а при инокуляции 5 клеток – на 6-й день (табл. 2).



Схема проведения непрямого варианта ИФА для индикации энтеропатогенных иерсиний в средах накопления

Таблица 2

Диагностические возможности совместного использования экспериментальных сывороток

Кол-во бактерий, внесенных в среды накопления		Время обогащения, сут		
		3	6	
		Разведения среды, показавшие положительный результат с экспериментальными сыворотками		
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	5·10 ⁵	1:8	1:32	
	5·10 ³	1:4	1:16	
	50	1:2	1:8	
	5	–	1:4	
<i>Y. enterocolitica</i>	5·10 ⁵	1:4	1:16	
	5·10 ³	1:2	1:8	
	50	Цельная	1:4	
	5	–	Цельная	
Контроль	без фекалий	с <i>Y. pseudotuberculosis</i>	1:4	1:16
		с <i>Y. enterocolitica</i>	1:4	1:16
	с фекалиями	Без иерсиний	–	–

Заключение

1. Иммунизация морских свинок ДА *Y. Pseudotuberculosis* в комплексе с ПААГ позволила получить гипериммунную сыворотку крови с родовой специфичностью.

2. Комплексное использование двух экспериментальных сывороток позволило выявлять в непрямом ИФА энтеропатогенных иерсиний на 3–6-е сут «холодового обогащения» в условиях значительного фекального загрязнения исследуемого материала.

Список источников

References

1. Зыкин Л.Ф., Щербаков А.А., Ханцев З.Ю. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных. Саратов, 2002. 67 с.
2. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.]. М.: Высш. шк., 1991. 288 с.
3. Manieson V.E., Ivaschenko S.V. The use of polyazolidineammonium and dimethyl-sulfoxide antigen *Yersinia pseudotuberculosis* to obtain hyperimmune serum // E3S Web of Conf. 2020. 175. 03011. DOI: 10.1051/e3sconf/202017503011.
4. Свойства диметилсульфоксид-фракции *Yersinia enterocolitica* / А. Хаджу [и др.] // Научная жизнь. 2014. № 6. С. 149–155.
5. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 608 с.
6. Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз / Е.В. Шекунова [и др.] // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2020. № 1 (10). С. 19–28.
7. Hornbeck P., Winston S.E., Fuller S.A. Enzyme-linked immunosorbent assays // Current Protocols in Molecular Biology. 2001. № 15. P. 15.
1. Zykin L.F., Scherbakov A.A., Hancev Z.Yu. Iersinioz i psevdotuberkulez sel'skohozyajstvennyh zhivotnyh. Saratov, 2002. 67 s.
2. Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza / A.M. Egorov [i dr.]. M.: Vyssh. shk., 1991. 288 s.
3. Manieson V.E., Ivaschenko S.V. The use of polyazolidineammonium and dimethyl-sulfoxide antigen *Yersinia pseudotuberculosis* to obtain hyperimmune serum // E3S Web of Conf. 2020. 175. 03011. DOI: 10.1051/e3sconf/202017503011.
4. Svoystva dimetilsul'foksid-frakcii *Yersinia enterocolitica* / A. Hadzhu [i dr.] // Nauchnaya zhizn'. 2014. № 6. S. 149–155.
5. Petrov R.V., Haitov R.M. Immunogeny i vakciny novogo pokoleniya. M.: GEOTAR-Media, 2011. 608 s.
6. Vybory doz preparatov dlya doklinicheskogo issledovaniya: mezhhvidovoy perenos doz / E.V. Shekunova [i dr.] // Vedomosti Nauchnogo centra 'ekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya. 2020. № 1 (10). S. 19–28.
7. Hornbeck P., Winston S.E., Fuller S.A. Enzyme-linked immunosorbent assays // Current Protocols in Molecular Biology. 2001. № 15. P. 15.

Статья принята к публикации 15.12.2022 / The article accepted for publication 15.12.2022.

Информация об авторах:

Сергей Владимирович Ивашенко¹, доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, доцент

Виктор Эммануэль Маниесон², аспирант кафедры микробиологии и биотехнологии

Ксения Александровна Петченко³, магистрант кафедры микробиологии и биотехнологии

Татьяна Владиславовна Спирихина⁴, доцент кафедры микробиологии и биотехнологии, кандидат биологических наук, доцент

Ольга Сергеевна Ларионова⁵, заведующая кафедрой микробиологии и биотехнологии, доктор биологических наук, доцент

Information about the authors:

Sergey Vladimirovich Ivashchenko¹, Associate Professor at the Department of Microbiology and Biotechnology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

Victor Emmanuel Manieson², Postgraduate Student at the Department of Microbiology and Biotechnology

Ksenia Aleksandrovna Petchenko³, Master Student at the Department of Microbiology and Biotechnology

Tatyana Vladislavovna Spiryakhina⁴, Associate Professor at the Department of Microbiology and Biotechnology, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor

Olga Sergeevna Larionova⁵, Head of the Department of Microbiology and Biotechnology, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor