

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СЕНСИТИНА ПОЛИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА

THE USE OF GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY TECHNOLOGY FOR ASSESSING SENSITIN OF POLYMERIC ANTIGENIC DIAGNOSTICUM

**D. Simakova
R. Pisanov
M. Zacharov
L. Larionova
N. Pavlovich**

Summary. Periodically pseudotuberculosis cases in the different countries of the world define relevance of improvement of laboratory diagnosis of a disease. By authors of this paper it is developed experimental polymeric diagnosticum on the basis of the antigens which are a part of proteins of outer membranes of *Y. pseudotuberculosis*. During the research of a sensitin by gas chromatography-mass spectrometry technology it is shown that the spectrum of the revealed fatty acids corresponds to the fatty acid profile of *Y. pseudotuberculosis* described in the literature and is represented by antigens of predominantly protein nature with minimum impurities of LPS.

Keywords: *Y. pseudotuberculosis*, pseudotuberculosis, gas chromatography-mass spectrometry, sensitin, fatty acids, lipopolysaccharides.

Симакова Диана Игоревна

Н.с., ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
740_280@mail.ru

Писанов Руслан Вячеславович

К.б.н., с.н.с., ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
pisanov.ruslan@yandex.ru

Захаров Михаил Викторович

Стажер-исследователь, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
emiraka@yandex.ru

Ларионова Людмила Владимировна

Н.с., ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
Larionova-1949@list.ru

Павлович Наталья Владимировна

Д.м.н., с.н.с., ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
info@tularemia.ru

Аннотация. Периодически случаи псевдотуберкулеза в разных странах мира определяют актуальность совершенствования лабораторной диагностики заболевания. Авторами разработан экспериментальный полимерный диагностикум на основе антигенов, входящих в состав белков наружных мембран *Y. pseudotuberculosis*. При исследовании сенситина методом газовой хромато-масс-спектрометрии показано, что спектр выявленных жирных кислот соответствует профилю *Y. pseudotuberculosis*, описанному в литературе, и представлен антигенами преимущественно протеиновой природы при минимальных примесях ЛПС.

Ключевые слова: *Y. pseudotuberculosis*, псевдотуберкулёз, газовая хромато-масс-спектрометрия, сенситин, жирные кислоты, липополисахарид.

Псевдотуберкулез — заболевание, вызываемое бактериями вида *Yersinia pseudotuberculosis*, широко распространено в мире, но более характерно для регионов с умеренным или холодным климатом [7; 8; 15]. Заболевание носит эпидемический, групповой или спорадический характер, характеризуется полиморфной симптоматикой, склонностью к рецидивирующему и хроническому течению инфекции [2; 23].

Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза включает в себя применение бактериологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов [13]. «Золотым стандартом» при постановке лабораторного диагноза является выделение культуры возбудителя, од-

нако данный метод наиболее информативен при острой стадии заболевания, поскольку на более поздних этапах болезни псевдотуберкулезный микроб не обнаруживается в крови и кишечном содержимом [3]. В связи с этим наиболее широкое применение при диагностике псевдотуберкулеза получили иммунологические методы, позволяющие выявлять специфические антитела в сыворотках крови больных — реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации, связывания комплемента, иммуноферментный анализ и иммуноблоттинг [4; 12].

В настоящее время актуальным является конструирование диагностических тест-систем на основе синтетических полимерных микросфер со специфическими биоли-

гандами для безаппаратной серологической диагностики [9]. Такие тест-системы не требуют применения специального оборудования, отличаются простотой проведения и возможностью визуальной оценки результата. В сочетании с высокими показателями специфичности и чувствительности иммуносупензионные методы успешно пополняют арсенал методов лабораторной серологической диагностики и используются при выявлении таких инфекционных заболеваний человека, как гистоплазмоз [19], сифилис [24], стронгилоидоз [26], сальмонеллез [5], бруцеллез [14], менингококковая инфекция [21], мелиоидоз [27] и т.д. Латексные диагностикумы применяются не только в медицине, но и в ветеринарии [22; 18].

На базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора был получен экспериментальный антигенный полимерный латексный препарат для диагностики псевдотуберкулеза в реакции агломерации объемной (РАО), являющейся одним из вариантов реакции агглютинации латекса, при этом в названии реакции сделано уточнение, что она проводится объемно, по типу РНГА, в микропланшетах для иммунологических реакций. На основании оценки операционных характеристик [10] полимерного антигенного псевдотуберкулезного диагностикума показаны его чувствительность (86%), специфичность (89%), точность (87%), рассчитан диагностический титр антител ($\geq 1:160$) для выявления псевдотуберкулеза у людей в РАО.

Высокая чувствительность и специфичность диагностического препарата обусловлены такими свойствами использованного сенситина, как иммуногенность (способность индуцировать выраженный антительный ответ), так и минимальным количеством общих эпитопов с другими видами бактерий. Белковую природу выявляемых антигенов подтверждали с помощью обработки препарата проназой К. Специфичность иммунодоминантных антигенов подтверждена методом иммуноблоттинга с экспериментальными сыворотками к возбудителю псевдотуберкулеза и близкородственным иерсиниям. Важным этапом также явилось выявление липополисахарида (ЛПС) в составе сенситина, который является высоко специфичным иммунодоминантным антигеном *Y. pseudotuberculosis*.

Цель работы — сравнительное изучение профиля жирных кислот (ЖК), присутствующих в бактериальном лизате *Y. pseudotuberculosis*, очищенных препаратах ЛПС и антигенного сенситина с помощью метода газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМСМ).

Материалы и методы

В работе был использован типовой штамм *Y. pseudotuberculosis* серовара O: 1a, отобранный из кол-

лекции музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Двухсуточную бактериальную массу, культивируемую на чашках с 2% агаром Хоттингера (pH 7,2±0,1) [3] после обеззараживания использовали для выделения белков наружных мембран *Y. pseudotuberculosis* и хромато-масс-спектрометрии. Сенситин (антигенная фракция штамма *Y. pseudotuberculosis* серовара O: 1a) был получен экстракцией белков из изолированных наружных мембран [20] с помощью N-лаурилсаркозината натрия [16; 25]. Анализ белкового состава лизата и сенситина исследовали электрофоретическим разделением по методике Laemmli (1970) в 12% полиакриламидном геле с 0,1% SDS (SDS-ПААГ) [16] с последующим окрашиванием гелевой пластины красителем Coomassie R-250. Специфичность выделенных иммунодоминантных антигенов оценивали методом иммуноблоттинга по методике Towbin [29] с экспериментальными сыворотками к *Y. pseudotuberculosis* и близкородственным иерсиниям. Препарат ЛПС был получен по методу Darveau R. P. и Hancock R. E. [17].

В ходе подготовки проб для проведения ГХМСМ к 3 мг исследуемого материала приливали 250 мкл метанола и высушивали при 80 °С. К сухому осадку добавляли 400 мкл 1,2 М HCl в метаноле (солянокислый метанол), прогревали при 80 °С в течение 45 мин, добавляли 500 мкл гексана и интенсивно перемешивали. Для разделения фаз пробу оставляли на 5 минут при комнатной температуре. Верхнюю фазу, содержащую гексан и метиловые эфиры жирных кислот, переносили в стеклянный виал объемом 2 мл и выпаривали при комнатной температуре. Далее в виал вносили 20 мкл BSTFA и прогревали при 80 °С 7–8 минут [6]. После этого 5 мкл препарата наносили на кварцевую хроматографическую колонку (Rtx-5MS, 30 м, 0,25 мм), покрытую поперечно сшитым-5% дифенил/95% диметил-полисилоксаном газового хромато-масс-спектрометра «Маэстро 2–7802» (ИнтерЛаб, Москва, Россия). Для управления и обработки данных использовали штатные программы прибора.

Результаты и обсуждение

Особенности химического состава бактериальных клеток широко используются для идентификации рода или вида микроорганизмов в чистой культуре [1]. К настоящему времени жирнокислотный состав большинства микроорганизмов изучен и доказана его родо- и видоспецифичность. В клетках прокариотов присутствуют жирные и циклопропановые кислоты, альдегиды, причем высшие жирные β -оксикислоты присущи только грамотрицательным микроорганизмам [6; 11; 30]. Для определения клеточных липидов — высших жирных кислот (ЖК), альдегидов, спиртов и стиролов — используется высокочувствительный и селективный метод газовой

Таблица 1. Сравнительный анализ спектра ЖК в бактериальном лизате, ЛПС, сенситине

| № п/п | Усл. обознач. | Жирная кислота | лизат | ЛПС | сенситин |
|-------|---------------|------------------------------|--------------------|-------|----------|
| | | | % от общего кол-ва | | |
| 1 | 14:0 | тетрадекановая | 1,08 | - | 0,49 |
| 2 | 3h14:0 | 3-гидрокситетрадекановая | 7,73 | 43,79 | 0,49 |
| 4 | 15:0 | пентадекановая | 2,98 | - | - |
| 5 | 9h15:0 | 9-гидроксипентадекановая | 2,05 | - | - |
| 6 | 16:0 | гексадекановая | 35,39 | 23,86 | 32,69 |
| 7 | 16:1d9 | 9-гексадеценная | 6,11 | 7,16 | 0,54 |
| 8 | 10h16:0 | 10-гидроксигексадекановая | 1,52 | - | - |
| 9 | 17:0 | гептадекановая | 3,21 | - | - |
| 10 | 17:1d10cis | цис-10-гептадеценная | 6,94 | - | 1,83 |
| 11 | 17:1d10 | 10-гептадеценная | 3,89 | - | - |
| 12 | 18:0 | октадекановая | 4,59 | 11,79 | 56,15 |
| 13 | 18:1d9 | 9-октадеценная | 12,45 | 2,62 | - |
| 14 | 11h18:0 | 11-гидроксиоктадекановая | 1,69 | - | - |
| 15 | 9сус18:0 | 9-цикло-октадекановая | 5,47 | - | - |
| 16 | 10h18:0 | 10-гидроксиоктадекановая | 0,45 | - | 0,6 |
| 17 | 9сус19:0 | 9-цикло-циклопропандекановая | 0,87 | - | 0,04 |
| 18 | | дибутилфталат* | 3,58 | 10,78 | 0,77 |
| 19 | | L-аланин ** | - | - | 2,25 |
| 20 | | бензенпропановая * | - | - | 4,15 |

* компонент лабораторного пластика, используемого при проведении исследования

** продукт гидролиза белка

хромато-масс-спектрометрии (ГХМСМ). Тип продуцируемых ЖК и относительные концентрации индивидуальных ЖК характерны для того или иного вида бактерий. Более того, ЛПС, присущий грамотрицательным бактериям, может содержать в своем составе видоспецифичные ЖК [6; 30].

Нами были исследованы бактериальный лизат *Y. pseudotuberculosis*, сенситин (фракция антигенов наружных мембран) и очищенный препарат ЛПС. Исследуемые образцы подвергались кислоте метанолизу, в ходе которого происходило высвобождение ЖК из сложных липидов в виде метиловых эфиров, альдегидов — в виде диметилацеталей. Во всех исследуемых образцах выявлены ЖК, входящие в состав как наружных мембран, так и в состав липида А ЛПС (Таблица 1).

В бактериальном лизате *Y. pseudotuberculosis* серовара O: 1a выявлены 17 ЖК, среди которых преобладают гексадекановая кислота (35,39%), 9-октадеценная кислота (12,45%), 3-гидрокситетрадекановая кислота (7,73%), цис-10-гептадеценная кислота (6,94%), 9-гексадекановая кислота (6,11%) и их производные. Остальные кислоты представлены в меньшем количестве. В препарате ЛПС выявлено 5 различных ЖК, основная масса которых представлена 3-гидрок-

ситетрадекановой (43,79%) и гексадекановой кислотой (23,86%), октадекановой кислотой (11,79%), а также их производными. В антигене препарата белков наружных мембран возбудителя псевдотуберкулеза серовара O: 1a также выявлено 8 ЖК, при этом большая их часть представлена октадекановой и гексадекановой кислотами (56,15 и 32,69%, соответственно). При этом содержание 3-гидрокситетрадекановой кислоты составляет 0,49%.

Известно, что одним из компонентов липида А ЛПС грамотрицательных бактерий является 3-гидрокситетрадекановая кислота [11; 30; 28]. Данные хромато-масс-спектрометрии показали ее присутствие во всех трех исследованных препаратах. В лизате *Y. pseudotuberculosis* серовара O: 1a содержание данной кислоты — 7,73%, в препарате ЛПС — 43,79%, в препарате белков наружных мембран — 0,49% от общего объема. Выявленная 3-гидрокситетрадекановая кислота является одним из компонентов липида А ЛПС грамотрицательных бактерий, что позволяет использовать ее в качестве маркера ЛПС.

Анализируя полученные данные, мы можем рассматривать сенситин на основе белков наружных мембран возбудителя псевдотуберкулеза как препа-

рат с антигенами преимущественно протеиновой природы с незначительным содержанием примеси ЛПС. При этом присутствие ЛПС в составе сенситина может повысить чувствительность полученного полимерного препарата.

Полученные данные позволяют рассматривать возможность применения метода ГХМСМ для оценки качества, ЖК композиции и чистоты антигенных препаратов, используемых в качестве сенситина при создании полимерных диагностических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрюков Б.Г., Тимченко Н. Ф., Недашковская Е. П., Соколова Л. И. Анализ закономерностей состава жирных кислот в различных штаммах энтеропатогенных видов бактерий рода *Yersinia* // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2015. № 5 (63). С. 31–35.
2. Кокорина Г. И. Генотипы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* и их клиническое и диагностическое значение: дис. . . канд. мед. наук. СПб., 2013. 133 с. Получение полистирольных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц для создания диагностических тест-систем на сальмонеллез / Лобанова Н. А., Грицкова И.А, Прокопов Н. И. и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 4 (9). С. 100–105.
3. Лабораторная диагностика инфекционных болезней. Справочник / Под ред. В. И. Покровского, М. Г. Твороговой, Г. А. Шипулина // М., 2013. 648 с.
4. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева // М., 2013. 560 с.
5. Лобанова Н.А., Грицкова И.А, Прокопов Н. И. и др. Получение полистирольных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц для создания диагностических тест-систем на сальмонеллез // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 4 (9). С. 100–105.
6. Осипов Г.А., Демина А. М. Хромато-масс-спектрометрическая индикация микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах // Вестник РАМН. 1996. Т. 13. № 2. С. 15–27.
7. Панин А. Л., Краева Л. А., Сбойчаков В. Б. и др. Микробиологический мониторинг иерсиний как основа санитарно-эпидемиологического надзора за иерсиниозами в организованных коллективах // Инфекция и иммунитет. 2013. № 3. С. 217–228.
8. Сомова Л. М., Плехова Н. Г., Дробот Е. И., Ляпун И. Н. Псевдотуберкулез: патогенетическое значение клеток врожденного иммунитета // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2017. № 5. С. 78–90.
9. Станишевский Я. М. Создание тест-систем для безаппаратной диагностики динамических макромолекулярных маркеров (Сообщение 2. Практические аспекты) // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2014. № 4 (9). С. 90–99.
10. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины // М., 1998. 318 с.
11. Химический анализ в медицинской диагностике / Под ред. Г. Будникова // Проблемы аналитической химии. Том 11. М., 2010. С. 293–368.
12. Чеснокова М.В., Климов В. Т., Каримова Т. В., Тирских К. А., Афанасьев М. В. Алгоритм лабораторной диагностики иерсиниозов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2010. № 17. С. 188–192.
13. Эпидемиологический надзор и профилактика псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза: Методические указания 3.1.1.2438–09. — М., 2009. — 68 с.
14. Abdoel T. H., Smits H. L. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2007. 57 (2). P. 123–128.
15. Amphlett A. Far East Scarlet-Like Fever: A Review of the Epidemiology, Symptomatology, and Role of Superantigenic Toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen A // Open Forum Infect Dis. 2015. Vol. 3 (1) /doi: 10.1093/ofid/ofv202.
16. Barenkamp S. J. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer-membrane protein profiles // J. Infect Dis. 1981. Vol. 143. P. 668–676.
17. Darveau R. P., Hancock R. E. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains // J. Bacteriol. 1983. V. 155(2). P. 831–838.
18. de Mendonça I. L., Batista J. F., Schallig H. et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2017; 59: e39. DOI: 10.1590/S1678–9946201759039.
19. Gerber J. D., Riley R. E., Jones R. D. Evaluation of a Microtiter Latex Agglutination Test for Histoplasmosis // Appl. Microbiol. 1972. Vol. 24 (2). P. 191–197.
20. Lohia A., Chattergee A. N., Das J. Lysis of *Vibrio cholerae* cells: Direct isolation of the outer membrane from whole cells by treatment with urea // J. of General Microbiology. 1984. Vol. 130. Part 8. P. 20–27.
21. Mohammadi S. F., Patil A. B., Nadagir S. D., Nandihal N., Lakshminarayana S. A. Diagnostic value of latex agglutination test in diagnosis of acute bacterial meningitis // Ann. Indian. Acad. Neurol. 2013. Vol. 16 (4). P. 645–649.
22. Mohan A., Saxena H. M., Malhotra P. A comparison of titers of anti-*Brucella* antibodies of naturally infected and healthy vaccinated cattle by standard tube agglutination test, microtiter plate agglutination test, indirect hemagglutination assay, and indirect enzyme-linked immunosorbent assay // Vet. World. 2016. Vol. 9 (7). P. 717–722.
23. Palonen E. Sequence variability of virulence genes and stress responses in *Yersinia pseudotuberculosis* // <http://urn.fi/URN:ISBN:ISBN978–951–51–0507–3>.
24. Pope V., Fears M. B., Morrill W. E., Castro A., Kikkert S. E. Comparison of the Serodia *Treponema pallidum* particle agglutination (TP-PA), Captia Syphilis-G, and Spiro Tek Reagin II tests with standard test techniques for the diagnosis of syphilis // J. Clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. P. 2543–2545.
25. Rapp V. J., Munson R. S., Ross R. F. Outer Membrane Protein Profiles of *Haemophilus Pleuropneumoniae* // Infect. Immun. 1986. Vol. 52 (2). P. 414–420.
26. Sithithaworn J., Sithithaworn P., Janrungsopa T. et al. Comparative Assessment of the Gelatin Particle Agglutination Test and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Strongyloidiasis // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43 (7). P. 3278–3282.
27. Suttisunhakul V., Chantratita N., Wikraiphat C. et al. Evaluation of Polysaccharide-Based Latex Agglutination Assays for the Rapid Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei* // Am. J. Trop. Med. Hyg. 2015. Vol. 93 (3). P. 542–546.

28. Tan Y., Wu M., Liu H. et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* // The society for applied microbiology. Letters in Applied Microbiology. 2010. Vol. 50. P. 104–111.
29. Towbin H., Stacylin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some application // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, № 9. P. 4350–4354.
30. Whittaker P. Comprasion of *Yersinia pestis* to the closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles // Food chemistry. 2009. № 116. P. 629–632.

© Симакова Диана Игоревна (740_280@mail.ru), Писанов Руслан Вячеславович (pisanov.ruslan@yandex.ru),
Захаров Михаил Викторович (emiraka@yandex.ru), Ларионова Людмила Владимировна (Larionova-1949@list.ru),
Павлович Наталья Владимировна (info@tularemia.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Ростов-на-Дону