

УДК 616.98:579.842.23

А.В. БОЙКО\*, М.Н. КИРЕЕВ, Н.А. ОСИНА, В.Е. КУКЛЕВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Саратов, 410005

e-mail: boyko49@yandex.ru

## Композитный диагностикум для выявления антител к видоспецифическому антигену чумного микроба (фракция 1) методом дот-иммуноанализа

Разработан композитный диагностикум для детекции антител к видоспецифическому капсульному антигену *Yersinia pestis* (фракция 1) на основе оптически меченого углерода и очищенного антигена. Теоретически и экспериментально показаны его преимущества в сравнении с диагностикумами, основанными на сорбции антианалитов на оптически меченом углероде. Использование привитого сополимера позволило повысить чувствительность метода дот-иммуноанализа в 4 раза.

*Ключевые слова:* дот-иммуноанализ, композитный диагностикум.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-49-55

В настоящее время эпидемическая ситуация с чумой остается напряженной. Так, в мире ежегодно регистрируется до 2,5 тыс. больных и сохраняется значительное количество природных очагов этой инфекции [1, 2]. Только в России находятся 11 природных очагов чумы, площадь которых составляет более 253 тыс. кв. км, причем на этих территориях регулярно развиваются эпизоотии [3, 4]. Например, в 2008 г. площадь эпизоотий в природных очагах чумы составила 1122 кв. км и было выделено 157 штаммов — возбудителей чумы (в 2006 г. — 161, в 2007 г. — 102 штамма) [3].

Одним из ключевых мероприятий в системе эпидемиологического надзора за чумой служит эпизоотологическое обследование природного очага, главной задачей которого является «как

можно более раннее обнаружение эпизоотии чумы» [4].

Следует учесть, что латентная фаза весенних эпизоотий чумы фиксируется только серологическими методами, позволяющими выявить антитела к F1-антигену у животных в очаге [5]. Исходя из этого факта, а также особенностей проведения эпизоотологических работ необходимо признать, что совершенствование и развитие серологической диагностики должно быть направлено на создание и разработку не только аппаратно насыщенных методов исследования, но и простых в исполнении методик, не требующих инструментального выявления специфических чумных антител и в то же время позволяющих обеспечить эффективность и быстроту серодиагностики чумы.

---

Бойко Андрей Витальевич, Киреев Михаил Николаевич, Осина Наталья Александровна, Куклев Василий Евгеньевич.

*Список сокращений:* БСА — бычий сывороточный альбумин; ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения; ДС — диагностическая специфичность; ДЧ — диагностическая чувствительность; РНГА — реакция непрямой гемагглютинации; ФСБ — фосфатно-солевой буфер; F1 — фракция 1 капсульного антигена чумного микроба.

\* Автор для переписки.

Разработаны несколько диагностикумов, предназначенных для выявления антител к фракции 1 (F1) чумного микроба, имеющие свои достоинства и недостатки.

Эритроцитарный чумной антигенный диагностикум для обнаружения специфических антител к F1 в сыворотке крови функционирует с использованием реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Среди недостатков, присущих эритроцитарным диагностикумам, характерны следующие: трудность стандартизации эритроцитов и, как следствие, нестандартность диагностикумов; отсутствие 100%-ной специфичности у чумного эритроцитарного поликлонального диагностикума, а также снижение специфичности анализа из-за наличия в исследуемом материале протеолитических ферментов, гетероантигенов или возникновения спонтанной агглютинации диагностикума в нормальной кроличьей сыворотке, используемой в качестве стабилизатора для разведения исследуемых материалов [6, 7].

Известна иммуноферментная тест-система для выявления антител к чумному микробу (ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*) [8, 9]. Данный диагностикум характеризуется теми же недостатками, что и другие иммуноферментные тест-системы: необходимость сложного и дорогостоящего оборудования и специальной подготовки персонала; наличие дополнительного этапа субстратного проявления комплексов антител с мечеными ферментом антигенами (что увеличивает время анализа), а также использование канцерогенных веществ.

Известен антигенный F1-диагностикум, разработанный на основе окрашенного полиакролеинового латекса [10]. Однако и группа латексных диагностикумов имеет свои недостатки: партии латекса разнятся по сорбционной активности, что затрудняет стандартизацию диагностикума; гидрофильные участки латексного носителя экранируют полимерные цепи иммунореагентов в поверхностном слое латексных частиц, что снижает чувствительность диагностикума; при использовании сорбционных методов нагрузки латексных частиц чувствительность диагностикума снижается в 4—8 раз уже в течение 1 мес; зачастую срок использования латексных диагностикумов сокращается за счет десорбции специфического белка с поверхности полимера из-за конкуренции с балластным белком, содержащимся в диагностикуме. И наконец, латексным диагностикумам присущ недостаток, характерный для всех систем, используемых в иммуносупернатантных реакциях — неспособность выявить неполные антитела прямыми

методами, что также уменьшает их чувствительность [10—13].

ВОЗ считает развитие и использование иммунохроматографического метода для выявления инфекционных болезней [14] важным направлением в совершенствовании их диагностики. Этот метод отличается простотой постановки и быстротой анализа, не требует дорогостоящего оборудования и специальных навыков персонала, предоставляет возможность сохранения результатов (в том числе и путем фоторегистрации), а также обладает высокой чувствительностью и достоверностью.

Описан один из таких диагностикумов, содержащий компонент с углеродной меткой для дот-иммуноанализа, на котором сорбирован видоспецифический F1, полученный из штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ [15]. Основным недостатком системы является то, что этот антиген конъюгирован с углеродной частицей путем обратимой физической адсорбции. При хранении диагностикума в нем устанавливается адсорбционное равновесие, в результате которого в системе постоянно присутствует некоторое количество антигена в свободном, не связанном с оптической меткой состоянии. Несвязанные антигены будут конкурировать с сорбированным антигеном в иммунохимической реакции, тем самым снижая чувствительность диагностикума. Добавление в такой диагностикум неспецифических белков или полимеров с целью блокировать свободные сорбционно-активные участки на оптически меченом компоненте и предотвращать неспецифическое связывание диагностикума с антителами приводит к конкуренции этих белков и полимеров с сорбированным антигеном, что приводит к еще большему снижению чувствительности диагностикума.

Целью настоящей работы являлась разработка диагностикума для выявления антител к чумному F1-антигену методом дот-иммуноанализа, который был бы лишен указанных недостатков.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы.** В работе использовали следующие вещества: бычий сывороточный альбумин (БСА); твин-20 (Amresco, США); нитроцеллюлозную мембрану ("Владисарт", Россия) с размером пор 0,2 мкм; этанол; 0,1 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ), pH 7,0—7,4; глутаровый альдегид (BASF, Германия); лизин (Sigma, США); уголь активированный МС (ЗАО «Медисорб», Россия), а также видоспецифический капсультный антиген

— фракция 1 чумного микроба (получен во ФКУЗ "РосНИПЧИ «Микроб»" из штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ по методике, описанной Л.Н. Сердобинцевым с соавт. [16]).

**Использовали следующие чумные агглютинирующие сыворотки крови:** С.71, к.333, титр 1:1280 (Иркутский НИПЧИ); С.114, к.565, титр 1:1280; С.113, к.597, титр 1:1280; С.113, к.597, титр 1:1280 (РосНИПЧИ «Микроб»).

Использовали также сыворотки крови людей, не содержащие антитела к чумному антигену F1.

**Дот-иммуноанализ.** Исследуемую сыворотку крови разводили забуференным физиологическим раствором (ФСБ). 2 мкл разведенной сыворотки наносили на стрип из нитроцеллюлозной мембраны, который высушивали на воздухе в течение 15 мин. Высушенный стрип помещали в блокирующий раствор (1%-ный БСА в 0,1 М ФСБ) на 15 мин при комнатной температуре. После этого стрип промывали физиологическим раствором с 0,05% твина-20. На стрип наносили готовый диагностикум и инкубировали при комнатной температуре 30—60 мин. По окончании инкубации стрип промывали дистиллированной водой и высушивали на фильтровальной бумаге. При наличии в исследуемой сыворотке крови антител, специфичных к чумному капсульному антигену F1, на месте нанесения сыворотки крови образовывалось темное пятно, отличное от фона. Титр сыворотки определяли по максимальному разведению, при котором регистрировалось темное пятно в реакционной зоне.

**Оценка диагностической чувствительности (ДЧ).** Для определения ДЧ использовали формулу:

$$\text{ДЧ} = \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО}) \cdot 100\%,$$

где ИП — количество истинно положительных результатов исследования сывороток крови, содержащих антитела данной специфичности; ЛО — количество ложноотрицательных результатов исследования сывороток крови, содержащих антитела данной специфичности.

**Величину диагностической специфичности (ДС)** определяли по формуле:

$$\text{ДС} = \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП}) \cdot 100\%,$$

где ИО — количество истинно отрицательных результатов исследования сывороток крови, не содержащих антитела данной специфичности; ЛП — количество ложноположительных результатов исследования сывороток крови, не содержащих антитела данной специфичности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приготовление композитного диагностикума включает несколько этапов:

**А. Приготовление оптически меченого носителя, содержащего частицы заданного размера, которые выполняют также и роль армирующего элемента в композиции.** Его подготовку проводили по методике Т.А. Полуниной с соавт. [15] в нашей модификации. Активированный уголь тщательно измельчали, смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:20 и проводили дополнительную ультразвуковую дезинтеграцию при частоте излучения 22 кГц и мощности 400 Вт в течение 10 мин.

Полученную угольную суспензию трижды отмывали дистиллированной водой от наполнителя, содержащегося в таблетированной форме угля, с использованием центрифугирования при 19000 g по 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в начальном количестве дистиллированной воды и повторно проводили ультразвуковую дезинтеграцию при указанном режиме.

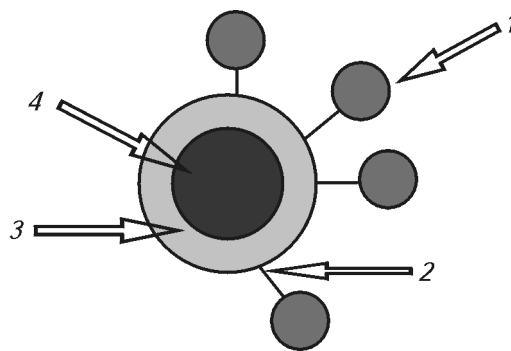
Далее угольную суспензию центрифугировали при 4700 g в течение 5 мин для удаления крупных частиц угля. Супернатант содержал угольные частицы размером не более 500 нм (контролировали микроскопией).

**Б. Приготовление композитного носителя путем создания полимерной матрицы на поверхности оптически меченого угля и его активация путем присоединения спейсера.** Суспензию (5 мл), приготовленную на первом этапе и содержащую 20 мг/мл угольных частиц, добавляли к 20 мл раствора БСА (10 мг/мл белка в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2) при постоянном интенсивном перемешивании путем пипетирования. Полученную смесь обрабатывали ультразвуком в течение 10 с при 22 кГц и мощности 400 Вт и инкубировали при температуре 10° в течение 24 ч для физической адсорбции БСА на оптически меченых частицах. По окончании адсорбции угольно-белковую суспензию отмывали трехкратно ФСБ, pH 7,2, с центрифугированием при 19000 g 20 мин. Осадок ресуспендировали в 5 мл 0,1 М ФСБ, pH 7,2.

Для формирования полимерной матрицы в 20 мл 25%-ного глутарового альдегида, являющегося бифункциональным спейсером, добавляли при постоянном мягком перемешивании (переворачивание пробирки каждые 5—10 мин) полученную угольно-белковую суспензию. Смесь инкубировали 4 ч при мягком перемешивании и комнатной температуре для образования полимерной

**Рис. 1.** Схема частицы композитного чумного антигенного F1-диагностикума: 1 — антиген F1; 2 — спейсер; 3 — полимерная форма БСА; 4 — оптически активная метка

**Fig. 1.** Scheme of a particle of composite plague antigenic F1 diagnostic kit: (1), F1; (2), spacer; (3), polymeric form of BSA; and (4), optically active label



формы БСА на поверхности угольных частиц и формирования на поверхности функциональных групп —СОН, способных связываться со свободными аминоклуппами белков.

Образовавшуюся суспензию активированного композита отмывали от непрореагировавших компонентов 0,1 М ФСБ, рН 7,2, дополнительно содержащего 0,01 % неионного детергента (твин-20), с использованием не менее 4 раз центрифугирования при 19000 г в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали пипетированием в 5 мл 0,1 М ФСБ, рН 7,2, содержащего 0,01% твина-20. Добавление неионного детергента способствует стабилизации композитных частиц, что позволяет проводить многократное центрифугирование и ресуспендирование, обеспечивая тем самым возможность полноценной очистки диагностикума от непрореагировавших соединений [17].

**В. Формирование привитого сополимера чумного антигена F1 на поверхности активированного композита.** Для этого к 5 мл полученной суспензии активированного композита при постоянном перемешивании добавляли 1 мл F1 (концентрация 5 мг/мл). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 5 ч при мягком перемешивании (без использования вортекса или ультразвука). При увеличении времени инкубации увеличивается количество ковалентно связанного антигена.

**Г. Блокирование свободных активных групп спейсера.** На этом этапе к 5 мл суспензии композитных частиц, содержащих полимерную матрицу в виде привитого сополимера F1, добавляли 3 мл 1 М раствора лизина (рН 7,0) для блокировки свободных активных групп спейсера. Смесь инкубировали 5 ч при мягком перемешивании.

**Д. Очистка композитных частиц диагностикума и его стабилизация.** Полученную взвесь композитных частиц диагностикума четырехкратно отмывали от несвязавшихся реагентов (с применением центрифугирования при 19000 г в течение

20 мин) 0,1 М ФСБ, рН 7,2, содержащим 0,005% твина-20.

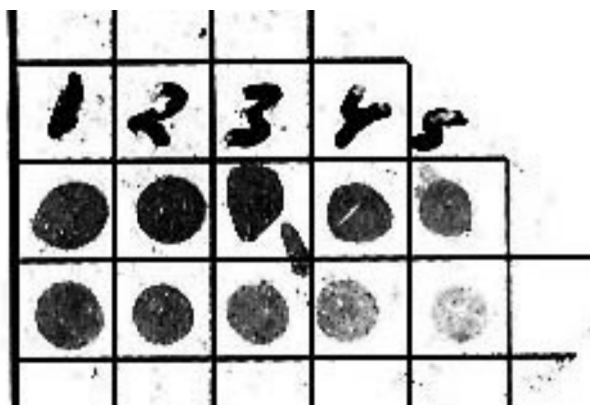
После отмывки частиц диагностикума осадок ресуспендировали пипетированием в 5 мл забуференного 0,9%-ного раствора хлорида натрия, рН 7,2, содержащего 0,5% БСА и 0,005% твина-20, а для консервации добавляли мертиолят натрия (Fluka, Швейцария) в конечном разведении 1:10000.

Данный диагностикум для индикации специфических антител к F1 представляет собой взвесь композитных частиц, состоящих из оптически меченного углерода и имеющих размер не более 500 нм, заключенных в полимерную матрицу, которая представляет собой привитой сополимер бычьего сывороточного альбумина с чумным капсульным антигеном. Схема полученного композитного диагностикума представлена на рис. 1.

Полученный диагностикум апробирован в параллельных исследованиях сывороток крови, заведомо содержащих антитела к F1, и сывороток крови, не содержащих таких антител. На основании полученных данных определена диагностическая чувствительность и специфичность дот-иммуноанализа при использовании разработанного диагностикума. При разведении исследуемых сывороток крови 1:400 ДЧ метода, а также его ДС составили 100%. Результат анализа сыворотки крови, содержащей антитела к капсульному чумному антигену F1, представлен на рис. 2.

Оценку чувствительности разработанного диагностикума проводили в сравнении с диагностикумом, описанным в [15] (таблица). Из таблицы видно, что разработанный диагностикум позволяет выявлять в сыворотке крови антитела, специфичные к F1-антигену, в более высоких титрах. Таким образом, по чувствительности предложенный дот-иммуноанализ незначительно уступает иммуноферментному анализу [15, 18].

Повышение чувствительности дот-иммуноанализа возможно за счет стабилизации F1 на по-



**Рис. 2.** Дот-иммуноанализ сыворотки крови, содержащей антитела к F1, с использованием предлагаемого композитного антигенного чумного диагностикума. Цифрами (1—5) обозначены столбцы проб, содержащих различные разведения испытываемой сыворотки. Верхний ряд содержит двукратные разведения сыворотки (слева направо) от 1:50 до 1:800; нижний ряд — разведения сыворотки от 1:1600 до 1:25000

**Fig. 2.** Dot-immunoassay of blood serum containing anti-F1 antibodies using the suggested composite antigenic plague diagnostic kit. Figures (1—5) indicate columns of samples containing various dilutions of tested serum. Top row represents serum double dilutions from 1:50 to 1:800(from left to right); bottom row contains dilutions from 1:1600 to 1:25000

верхности матрицы композитных частиц путем ковалентных связей. Ковалентные связи значительно превосходят по прочности адсорбционные и не позволяют антигену F1 в предлагаемом диагностикуме находиться в свободном состоянии, как это имеет место в системе сравнения. В результате предотвращается конкурентное взаимодействие свободных, не связанных с углеродной меткой, молекул F1 с антителами исследуемой сыворотки, фиксированными в виде пятна (реакционная зона) на мембране.

Кроме того, белковые молекулы, введенные в жидкую часть диагностикума для его стабилизации, могут неспецифически связываться с белками сыворотки крови за счет белок—белкового взаимодействия и тем самым экранировать активные центры специфичных к антигену F1 антител, выступая таким образом в роли конкурентов специфической реакции антиген—антитело в обла-

сти реакционной зоны. Наличие ковалентной связи F1 с носителем позволяет вводить в диагностикум поверхностно-активные вещества из группы неионных детергентов (например, твин-20), которые предотвращают указанные белок—белковые взаимодействия в реакционной зоне, что также приводит к повышению чувствительности предлагаемого диагностикума. Суммируя, можно высказать уверенность, что использование ковалентной фиксации F1 на поверхности композитных частиц является перспективным направлением повышения чувствительности предлагаемого диагностикума.

Таким образом, экспериментально получены данные о том, что включение чумного антигена F1 в состав матрицы композита в качестве привитого сополимера позволило повысить чувствительность метода дот-иммуноанализа в 4 раза.

Получено 6.04.16

**Сравнительная характеристика диагностикумов для определения антител к фракции 1 чумного микроба методом дот-иммуноанализа**  
**Comparison of diagnostic kits for detection of antibodies to F1 plague cause antigen by dot-immunoassay**

Диагностикум Kit	Разведения сыворотки лошадиной чумной агглютинирующей Dilutions of horse agglutinating anti-plague serum						
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
Разработанный диагностикум Designed kit	++++	++++	+++	+++	++	++	—
Диагностикум, описанный в [16] Kit described in [16]	++++	+++	++	++	—	—	—

ЛИТЕРАТУРА

1. Грижебовский Г.М., Кальной С.М., Малецкая О.В. Чума в современном мире: Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств участников СНГ: Матер. X межгосударств. науч.-практ. конф. государств — участников СНГ (5—6 окт. 2010 г., Ставрополь). — Ставрополь: Экспо-Медиа, 2010. — С. 43—44.  
*Grizhebovskii, G.M., Kal'noy, S.M., and Maletskaya, O.V.* Plague in current world: Actual problems of prevention and liquidation of consequences of emergencies in sanitary-epidemiological wellbeing of populations of CIS states: Thes. X Interstate Scientific Practical Conf. of CIS States (October 5—6, 2010). — Stavropol: Экспо-Медиа, 2010. — P. 43—44.
2. Приказ Роспотребнадзора от 08.05.2008 № 152 «О совершенствовании организации и проведения мероприятий по профилактике чумы» <http://33.rospotrebnadzor.ru>  
Order of Rospotrebnadzor, May 8, 2008, N 152 “On Improvement of Organization and Performance of Anti-Plague Prophylaxis” <http://33.rospotrebnadzor.ru>
3. Пакскина Н.Д. Эпидемиологическая обстановка и основные направления профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Современные требования к организации санитарной охраны территории Российской Федерации в рамках реализации ММСР (2005) // Дезинфекционное дело. — 2009. — № 3. — С. 23—29.  
*Pakskina, N.D.* Epidemiological situation and general directions in prophylaxis of especially dangerous and natural-focus diseases in Russian Federation. Current requirements to organization of sanitary guard of RF territory within the frames of MMSP realization // *Dezinfektsionnoye Delo (Disinfection Matter)*. — 2009. — N 3. — P. 23—29.
4. Профилактика инфекционных болезней. Кровяные инфекции. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: Методические указания МУ 3.1.3.2355-08. [http://standartgost.ru/g/MY\\_3.1.3.2355-08](http://standartgost.ru/g/MY_3.1.3.2355-08)  
Prophylaxis of infectious diseases. Blood infections. Organization and epidemiological survey in natural foci of plague of RF territory: Methodical Instructions MU 3.1.3.2355-08, 2008 [http://standartgost.ru/g/MY\\_3.1.3.2355-08](http://standartgost.ru/g/MY_3.1.3.2355-08)
5. Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К. Эпизоотическая активность автономных степных сусликовых очагов чумы: Биобезопасность и зоонозные инфекции: Первая ежегодная конф. Ассоциации биологической безопасности Центральной Азии и Кавказа. — Алматы, 2009. — С. 47.  
*Bidashko, F.G., and Grazhdanov, A.K.* Epizootic danger of autonomic step gopher foci of plague. Biosafety and zoonotic infections: 1<sup>st</sup> Annual Conf of Association of Biological Safety in Central Asia and Caucasus. — Almaty, 2009. — P. 47.
6. Зайцев А.А. Теоретическое и научно-методическое обоснование использования белковых фракций чумного микроба при создании новых диагностических препаратов и тест-систем. Автореферат на соискание ученой степени доктора биологических наук <http://www.dissertcat.com>  
*Zaitsev, A.A.* Theoretical and scientific methodical rationale of the use of the plague microbe protein fractions in the design of new diagnostic preparations and test-systems. Thesis for Dissert. Doc. Biol <http://www.dissertcat.com>
7. Яникова Э.А., Юсупов О.Ю., Хаиров С.Г. Способ получения эритроцитарного диагностикума для реакции непрямой геммагглютинации (РНГА) с целью индикации бруцелл в патматериале // Патент РФ 2493871, А 61 К 39/10, G 01 N 33/53. 2013.  
*Yanikova, E.A., Yusupov, O.Yu., and Khairov, S.G.* Method for design of erythrocyte diagnostic kit for reaction of indirect hemagglutination (RIGA) in order to detect brucella in pathological material // Patent of RF 2493871, A 61 K 39/10, G 01 N 33/53. 2013.
8. Девдариани З.Л., Терешкина Н.Е., Голова А.Б., Шарова И.Н., Аленкина Т.В., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Ермаков Н.М., Терехова И.В., Полунина Т.В., Тараненко Т.М., Киреев М.Н. Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления антител к чумному микробу: Мат. конф. 3-ей науч.-практ. школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исслед. организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности». (31 мая—2 июня, 2011 г.). — Оболensk, 2011. — С. 178—180.  
*Devdariani, Z.L., Tereshkina, N.E., Golova, A.B., Sharova, I.N., Alenkina, T.V., Lobovikova, O.A., Shul'gina, I.V., Ermakov, N.M., Terekhova, I.V., Polunina, T.V., Taranenko, T.M., and Kireev, M.N.* Design of immunoenzyme test-system for indication of antibodies to plague microbe. Thes. Conf. 3<sup>rd</sup> Scientific Practical School-Conf. Young Researchers of Research Organ. of Rospotrebnadzor “Current technologies for providing biological safety” (May 31—June 2, 2011). — Obolensk, 2011. — P. 178—180.
9. Девдариани З.Л. Результаты модельных экспериментов по конструированию тест-системы иммуноферментной для выявления антител к Ф1 чумного микроба (ИФА-Ат\_Ф1 *Yersinia pestis*) / З.Л. Девдариани, Н.Е. Терешкина, Т.М. Тараненко, М.Н. Киреев, И.В. Терехова, Г.В. Григорьева, М.Н. Исаева, Н.М. Ермаков, Н.А. Виноградова, А.Н. Малахаева // Пробл. особо опасных инфекций. — 2013. — В.1. — С. 74—77.  
*Devdariani, Z.L.* Results of model experiments on construction of immunoenzyme test-system for indication of F1 antigen of plague microbe / Z.L. Devdariani, N.E. Tereshkina, T.M. Taranenko, M.N. Kireev, I.V. Terekhova, G.V. Grigorieva, M.N. Isaeva, M.N., Ermakov, N.M., N.A. Vinogradova, and A.N. Malakhaeva // *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy (Problems in Especially Dangerous Infections)*. — 2013. — Issue 1. — P. 74—77.
10. Зайцев А.А. Способ получения диагностикума суспензионного антигенного на основе фракции 1 // Патент РФ 2199750, G 01 N 33/531, G 01 N 33/569, А 61 К 39/02. 2003.  
*Zaitsev, A.A.* Method for obtaining of suspension antigenic diagnosticum based on Fraction 1 // Patent of RF 2199750, G 01 N 33/531, G 01 N 33/569, A 61 K 39/02. 2003.

11. *Вершигора А.Е.* Общая иммунология: учебное пособие. — Киев: Выща школа, 1990. — 736 с.  
*Vershigora, A.E.* General immunology: A manual. — Kiev: Vyshcha Shkola, — 1990. — 736 p.
12. *Зими́на Т.М., Лучинин В.В., Мигунова В.Е., Краева Л.А., Ценева Г.Я., Меньшикова А.Ю., Шабсельс Б.М., Дулатова М.В., Шпилюк Г.Ф.* Способ контроля биологической пробы в реакции латекс-агглютинации и аналитическая система для его осуществления // Патент РФ 2298798, G 01 N 33/546. 2007.  
*Zimina, T.M., Luchinin, V.V., Migunova, V.E., Kraeva, L.A., Tseneva, G.Ya., Menshikova, A.Yu., Shabsels, B.M., Dulatova, M.V., and Shpiliuk, G.F.* Method for control of biological sample in reaction of latex agglutination and analytical system of realization // Patent of RF 2298798, G 01 N 33/546. 2007.
13. *Леонова В.Б., Розенфельд М.А.* Иммунодиагностikum на основе полистирольного латекса // Патент РФ 2231366, A 61 K 51/08, G 01 N 33/569. 2004.  
*Leonova, V.B., and Rosenfeld, M.A.* Immunodiagnosticum based on polystyrene latex // Patent of RF 2231366, A 61 K 51/08, G 01 N 33/569. 2004.
14. Совещание стратегической консультативной группы экспертов по иммунизации, ноябрь 2011 года — выводы и рекомендации // Ежегод. эпидемиол. бюлл. — 6 января 2012. — В. 87. — № 1. — 16 с.  
Conference of Strategic Consulting Groups of Experts on Immunization, November 2011 — conclusions and recommendations // *Ezhenedel'nyi Epidemiologicheskii Bulletin* (Weekly Epidemiological Bulletin — January 6, 2012. — Issue 87. — N 1. — 16 p.
15. *Полунина Т.А.* Использование дот-иммуноанализа с углеродной меткой для тестирования специфических антител к возбудителям чумы и холеры / Т.А. Полунина, М.Н. Киреев, Т.М. Тараненко, О.В. Громова, Т.Л. Захарова // Биотехнология. — 2007. — № 6. — С. 72—75.  
*Polunina, T.A.* Use of dot-immunoanalysis with carbon label for testing of specific antibodies to plague and cholera causes / T.A. Polunina, M.N. Kireev, T.M. Taranenko, O.V. Gromova, and T.L. Zakharova // *Biotekhnologiya (Biotechnology)*. — 2007. — N 6. — P. 72—75.
16. *Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В.* Приготовление капсулярного антигена методом одностадийной гельфильтрации: Вопр. профилакт. природноочаговых инфекций. — Саратов: Коммунист, 1983. — С. 37—41.  
*Serdobintsev, L.N., Taranenko, T.M., Verenkov, M.S., and Naumov, A.V.* Preparation of capsular antigen by method of one-stage gel-filtration: Problems in prophylaxis of natural-focus infections. — Saratov: Kommunist, 1983. — P. 37—41.
17. *Titball, R.W., Shaw, A.M., Gregory, A.E.* Method for the Preparation of a Novel Nanoparticle Conjugate // *Internat. application published under the patent cooperation treaty.* — International application number: PCT/GB2011/000223. — International publication number: WO 2011/104497 A1. — International publication date: 1 September 2011 (01.09.2011), A 61 K 39/02; ; A 61 P 31/04; B 82 Y 5/00. 2011.
18. *Полтавченко А.Г.* Использование иммуносуспенси́й на основе углеродных маркеров для определения антител к вирусу паротита методом поверхностного дот-иммуноанализа / А.Г. Полтавченко, А.П. Агафонов, С.Н. Ничеухина, В.С. Караваев, Г.М. Игнатъев // Биотехнология. — 1999. — № 3. — С. 86—91.  
*Poltavchenko, A.G.,* Use of immunosuspensions based on carbon markers for detection of antibodies to mumps virus by surface dot-immunoflysis / A.G. Poltavchenko, A.P. Agafonov, S.N. Nicheukhina, V.S. Karavaev, and G.M. Ignatiev // *Biotekhnologiya (Biotechnology)*. — 1999. — N 3. — P. 86—91.

A.V. BOYKO\*, M.N. KIREEV, N.A. OSINA,  
and V.E. KUKLEV

The Russian Research Antiplague Institute *Microbe*, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 410005, Saratov Russia

e-mail: boyko49@yandex.ru

### A Composite Kit for Detection of Antibodies to Species-Specific Plague Microbe Antigen (Fraction 1) by Dot Immunoanalysis

A composite diagnosticum for detection of antibodies to species-specific capsular antigen of *Yersinia pestis* (fraction 1) based on carbon optical label and purified antigen has been designed. The advantages of the suggested preparation over systems based on the sorption of anti-analytes on carbon optical label were theoretically and experimentally shown. The use of F1 as a graft copolymer permitted to increase in the sensitivity of the dot-immunoanalysis by 4 times.

*Key words:* composite diagnosticum, dot-immunotest.

*Biotekhnologiya (Biotechnology)*, 2016, V. 32, N 4, P. 49—55.

\* Author for correspondence.