

УДК 579.61

DOI: 10.14427/jipai.2026.2.23

Аранжировка иммуноферментного метода, обеспечивающая снижение фоновых неспецифических взаимодействий сывороточных иммуноглобулинов с антигенами *B. pseudomallei*

И.В. Новицкая, Д.Л. Терешко, Л.А. Печенкина

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград

An arrangement of enzyme-linked immunosorbent assay to reduce background nonspecific interactions between serum immunoglobulins and *B. pseudomallei* antigens

I.V. Novitskaya, D.L. Tereshko, L.A. Pechenkina

Federal Government Health Institution «Volgograd plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Volgograd, Russia

Аннотация

Цель исследования: подбор условий проведения иммуноферментного анализа (ИФА), обеспечивающих достоверное снижение фоновых значений реакции, направленной на выявление сывороточных мелиоидозных антител.

Материалы и методы. При выполнении ИФА варьировали типы планшетов, блокирующие свободные поверхности лунок агенты, а также буферы для разведения проб и сенситина. Образцами для исследования служили сыворотки интактных и заражённых *B. pseudomallei* лабораторных животных, а также сыворотки человека, полученные от клинически здоровых лиц, проживающих на эндемичной по мелиоидозу территории и вне её.

Результаты и обсуждение. Специфическое выявление мелиоидозных антител в сыворотках экспериментальных животных, а также снижение фоновых взаимодействий в ходе исследования интактных сывороток человека достигнуто при блокировании свободных поверхностей лунок 5%-ным раствором сухого обезжиренного молока, а также использовании фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) – для сенсibilизации пластин и многокомпонентного Tris-HCl буфера (pH 8,0), содержащего в своём составе этиленгликоль, бычий сывороточный альбумин, хлорид натрия и Tween 20 – для разведения образцов. Обсуждается вопрос о возможности использования ИФА в предлагаемом варианте для иммунодиагностики мелиоидоза.

Ключевые слова

Burkholderia pseudomallei, антитела, мелиоидоз, иммунодиагностика, иммуноферментный анализ.

Summary

The aim of the study was to select the conditions for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that ensure a reliable decrease in background values of the reaction for detecting serum melioidosis antibodies.

Materials and methods. When performing ELISA, various types of plates, agents blocking the free surfaces of the wells, as well as buffers for diluting samples and antigen-coating were used. The samples for the study were sera of intact and *B. pseudomallei*-infected laboratory animals, as well as human sera obtained from clinically healthy individuals living in and outside the territory endemic for melioidosis.

Results and discussion. Specific detection of melioidosis antibodies in sera of experimental animals, as well as reduction of background interactions during the study of intact human sera, was achieved by blocking free surfaces of wells with a 5% solution of dry skim milk, as well as using phosphate-buffered saline (pH 7.4) for sensitization of plates and multicomponent Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing ethylene glycol, bovine serum albumin, sodium chloride and Tween 20 for sample dilution. The possibility of using the proposed version of ELISA in immunodiagnosics of melioidosis is discussed.

Keywords

Burkholderia pseudomallei, antibody, melioidosis, immunodiagnosics, ELISA.

Введение

Мелиоидоз – инфекционно-септическое заболевание людей и животных, вызываемое грамотрицательными бактериями II группы патогенности *Burkholderia pseudomallei*. Возбудитель мелиоидоза распространён в Юго-Восточной Азии, Южной и Центральной Америке, Африке, Австралии, где обитает во влажных слоях почв, а также в поверхностных и грунтовых водах. Нарушение целостности этих экологических ниш как вследствие природных катаклизмов, особенно часто возникающих в зоне тропиков и субтропиков, так и в результате урбанистической и сельскохозяйственной деятельности человека ведёт к потенциальному инфицированию населения и закономерному возрастанию в этих регионах заболеваемости мелиоидозом [1]. Однако на фоне увеличивающихся миграционных и туристических потоков всё более часто выявляют завозные случаи этой инфекции и вне эндемичных зон (в Европе, Северной Америке, странах Ближнего Востока и др.) [2]. В 2025 г. в России был также верифицирован случай мелиоидоза у 14-летней девочки, накануне вернувшейся из Таиланда (*post mortem*) [3]. Такие ситуации подтверждают потенциальную возможность возникновения мелиоидоза среди жителей в том числе и нашей страны, что диктует необходимость формирования среди персонала медицинских учреждений соответствующей клинической настороженности, а также создания подготовленной лабораторной базы для проведения соответствующих диагностических исследований.

Сложность выявления мелиоидозной инфекции усугубляется отсутствием патогномичных признаков и преобладанием в клинической картине на фоне генерализованного сепсиса общеинтоксикационных симптомов, быстро приводящих заболевание к фатальному исходу.

Несомненно, получение возбудителя в культуре является «золотым стандартом» и служит основой лабораторной диагностики любой инфекции. Однако ряд особенностей *B. pseudomallei*, таких как относительно невысокая скорость роста, склонность к полиморфизму и формированию атипичных колоний, способность переходить в некультивируемое состояние и др., резко снижают эффективность бактериологического анализа при мелиоидозе. В связи с этим некультуральные, включая иммунологические, методы экспресс-анализа приобретают решающее значение в верификации диагноза и, как следствие, в успешном исходе заболевания.

Одним из таких методов является ИФА, который нашёл широкое применение в практике при диагностике самых разных инфекций для целей обнаружения как антигенов возбудителя, так и антител, отражающих взаимодействие последнего с макроорганизмом [4,5].

Но если возможность детекции антигенов ограничена временем циркуляции возбудителя в крови, то выявление специфических сывороточных антител обеспечивает проведение диагностических исследований в значительно более широком временном диапазоне, позволяя при этом проследить состояние и динамику иммунного ответа больного.

Однако, согласно данным литературы, иммунодиагностические исследования при выявлении мелиоидозных антител с помощью такого высокочувствительного метода, как ИФА, сопровождаются определёнными сложностями, связанными, прежде всего, с перекрёстными взаимодействиями антител, направленных к антигенам близкородственных микроорганизмов [6,7].

Известно, что возбудитель мелиоидоза *B. pseudomallei* филогенетически в составе комплексов «*Burkholderia cepacia*» (Bcc), «*Burkholderia pseudomallei*» (Bpc) и группы «*Burkholderia glumae-gladioli*» [8,9] тесно связан со многими, в том числе и сапрофитическими, видами буркхольдерий – в частности, *B. thailandensis* и *B. cepacia*. Более того, выяснено, что структура его поверхностных биополимеров в значительной мере гомологична антигенным комплексам других грамотрицательных бактерий, причём не только близкородственных буркхольдерий [10] и псевдомонад (*P. aeruginosa*), но также *E. coli*, *C. jejuni*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. и др., что не может не приводить к появлению в ходе анализа неспецифических результатов [11,12].

Поэтому при проведении лабораторной диагностики мелиоидоза остро встаёт проблема перекрёстной реактивности иммунореагентов, которая проявляется тем более отчётливо, чем выше чувствительность применяемого метода, каковым является ИФА.

Целью исследования явился подбор условий проведения иммуноферментного анализа (ИФА), обеспечивающих достоверное снижение фоновых значений реакции, направленной на выявление сывороточных мелиоидозных антител.

Материалы и методы

В работе использовали образцы сывороток интактных и экспериментально заражённых возбудителем мелиоидоза лабораторных белых

мышей ($n=12$), а также нормальные сыворотки человека, полученные от лиц, проживающих в эндемичном регионе ($n=46$) и на территории Российской Федерации (РФ) ($n=46$).

Заражение экспериментальных животных (неинбредных белых мышей) осуществляли умеренно-вирулентным штаммом возбудителя мелиоидоза *B. pseudomallei* C-141 ($LD_{50}=2 \cdot 10^4$ м.к.), в дозе $2 LD_{50}$, с целью обеспечения относительно длительно текущей инфекции. Взятие крови проводили на 14 и 21 сут от начала опыта.

Все работы с животными осуществляли в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», а также Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. № 33 «О руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Исследование сывороток человека выполняли в соответствии с Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики. Данные, полученные от обследованных лиц, были использованы в обезличенном виде.

Твёрдой фазой ИФА служили планшеты Corning (США) средней (*Medium Binding*) и высокой (*High Binding*) степени сорбции, а также планшеты с химически модифицированной гидразидными группами поверхностью (*Carbo-BIND*).

В качестве буферных растворов использованы 50 мМ карбонат-бикарбонатный pH 9,4 (КББ), 10 мМ фосфатно-солевой pH 7,4 без добавления и с привнесением 0,05% Твин-20 (ФСБ и ФСБ-Тв соответственно), 0,1 М ацетатный (АБ), содержащий перйодат натрия (3,2 мг/мл) pH 5,5 (в случае использования планшетов Carbo-BIND), а также многокомпонентный (МКБ) на основе Tris-HCl буфер (pH 8,0), содержащий в конечных концентрациях этиленгликоль 5%, Tween 20 – 0,05%, бычий сывороточный альбумин (БСА) – 1% и хлорид натрия – 0,87%.

Для сенсибилизации поверхности лунок применяли антигенный комплекс дезинтегрированных ультразвуком клеток *B. pseudomallei* 57576 (10^8 м.к./лунку).

В качестве блокирующих свободные поверхности лунок агентов изучали растворы: (1-2)% бычьего сывороточного альбумина, 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% рыбьего желатина, 5% сухого обезжиренного молока.

Исследуемые сыворотки разводили последовательно десятикратным шагом 1:10–1:100 или

титровали двукратно от 1:100 до 1:12 800 в соответствующем буфере (ФСБ-Тв или МКБ).

Видовые антитела, меченные пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов человека (ИМ-ТЭК, Россия), а также мыши (ИМТЭК, Россия) применяли в рабочих разведениях, указанных в инструкциях к препаратам.

Субстратом выступал о-фенилендиамин (ОФД, Sigma, США) в концентрации 0,4 мг/мл 50 мМ цитратно-фосфатного буфера pH 5,0. Для остановки реакции использовали раствор 2 М серной кислоты в объёме 50 мкл/лунку.

Каждый этап реакции завершали не менее чем 5-кратным промыванием лунок раствором ФСБ-Тв.

Определение показателей оптической плотности (ОП) проводили на спектрофотометре Allsheng AMR-100T (Китай) при длине волны 492 нм.

За положительный результат принимали показатели ОП, превышающие среднее значение отрицательных контролей конъюгата на 0,2 оптических единицы (о.е.).

Полученные данные обрабатывали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prisma. Статистическую оценку осуществляли с использованием критериев Kruskal-Wallis и Mann-Whitney; доверительный интервал определяли методом Wilson.

Результаты и обсуждение

В нашей работе в ходе проведения непрямого ИФА по классической схеме при изучении сывороток лиц ($n=46$), постоянно проживающих вне эндемичной территории (Волгоградская область) и однозначно не имевших контакта с возбудителем мелиоидоза, при учёте результатов мы столкнулись с высоким уровнем фоновых значений ОП содержимого лунок (табл. 1).

Как следует из данных таблицы, среди 46 исследованных сывороток жителей РФ пробы, значения ОП которых $\geq 0,25$ (что соответствовало (0,047+0,2)), составили 23 наблюдения (50%). Эти результаты однозначно были расценены как проявление неспецифических взаимодействий. При этом в отдельных случаях (4,35%) показатели ОП лунок были более 2,01, т.е. превышали значение ОП контроля конъюгата в 40 раз.

Факт получения высоких фоновых реакций по результатам ИФА в образцах, в которых исключено присутствие иммуноглобулинов к *B. pseudomallei*, не мог не вызывать серьёзной обеспокоенности, в связи с чем задача отработки условий проведения ИФА как метода экспресс-диагностики мелиоидоза приобрела ещё большую значимость.

Отсутствие в РФ сывороток больных мелиоидозом пациентов, которые могли бы служить положительным контролем выполняемых исследований, явилось основанием для проведения экспериментов на моделях лабораторных животных (белых мышей), заражённых штаммом *B. pseudomallei* C-141, отличающимся умеренной вирулентностью, что обеспечивало возможность забора сывороток в сроки, достаточные для формирования иммунного ответа (не менее чем через (14-21) сут с момента введения культуры возбудителя мелиоидоза).

При проведении ИФА в качестве твёрдой фазы были использованы пластины *Costar Medium Binding*, *High Binding* и *Carbo-BIND*, в которых связывание сенситина происходит путём формирования гидрофобных, гидрофобных и ионных, а также ковалентных связей соответственно [13].

Буферами для нанесения на твёрдую фазу сенситина служили растворы с такими значениями pH, при которых происходящие конформационные изменения молекул обеспечивают высвобождение гидрофобных областей антигенов и доступность их активных центров [14].

Для сенсibilизации планшетов средней и высокой сорбции в литературе описано применение как карбонатно-бикарбонатного pH 9,4, так и фосфатно-солевого pH 7,4 забуференных растворов. В случае выполнения исследований на планшетах, где отдельные микроструктуры сенситина присоединяются к поверхности твёрдой фазы через ковалентные электронные орбитали, используют кислый ацетатный буфер pH 5,5 [15].

Возможность влияния на выходные данные ИФА различных блокирующих свободные поверхности лунок агентов изучены нами на примере бычьего сывороточного альбумина в разных концентрациях (1% и 2%), эмбриональной телячьей сыворотки, гидролизата рыбьей чешуи, а также сухого обезжиренного молока [16].

Сводные результаты таких исследований, выполненных на образцах мелиоидозной (n=6) и нормальной (n=6) сывороток неинбредных белых мышей, изученных в стандартно используемом титре 1:100, представлены в табл. 2.

Как следует из данных таблицы, независимо от типа планшетов во всех без исключения наблюдениях ОП образцов с нормальной мышинной сывороткой превышала ОП контролей конъюгата более чем в 2 раза и более чем на 0,2 о.е.

Следует, однако, отметить, что разница между показателями ОП лунок, в которые были внесены мелиоидозные сыворотки, и лунок с интактными

сыворотками проявлялась значительно более отчётливо (в 1,5 раза) на планшетах с ковалентным связыванием сенситина по сравнению с твёрдой фазой, ориентированной на формирование гидрофобных и гидрофобно-ионных связей. Так, если при проведении ИФА на планшетах как *Medium*, так и *High Binding* в обоих случаях ОП_{ММС} превалировала над показателями ОП_{НМС} в 2,4 раза, то при использовании планшетов *Carbo-BIND* этот коэффициент составил 3,8.

Однако в целом по отношению к показателям ОП контроля конъюгата значения экстинкции в лунках с интактными сыворотками на любом из изученных типов планшетов оказались непозволительно высокими, во всех случаях превышая ОП_{кк} значительно больше, чем на 0,2 о.е. Такие результаты явно подтверждали наличие неспецифических взаимодействий иммуноглобулинов нормальных сывороток с компонентами иммуноферментной мелиоидозной тест-системы, и изначально в любой изученной аранжировке реакции окончательно фоновый сигнал ОП нивелировать не удавалось.

Явное преимущество продемонстрировали: в качестве раствора для сенсibilизации лунок – фосфатно-солевой буфер, pH 7,4 (по сравнению с КББ, pH 9,4), а как сенситин – 5% раствор сухого обезжиренного молока. Независимо от типа планшета или используемого сенсibilизирующего буфера внесение в лунки в качестве блокирующего свободные поверхности агента 5%-ного раствора сухого обезжиренного молока приводило к более отчётливой разнице в показателях экстинкции мелиоидозной и нормальной сывороток.

И, наконец, достоверное снижение неспецифических взаимодействий при постановке ИФА получено нами при использовании в качестве дисперсионной среды, в которой осуществляется взаимодействие антигена с антителом, вместо традиционно применяемого ФБР-Tw pH 7,2-7,4 многокомпонентного Tris-HCl буфера pH 8,0 (МКБ), имеющего в своём составе: хлорид натрия для поддержания ионной силы раствора (0,87%); бычий сывороточный альбумин в качестве стабилизатора компонентов реакции (1%); неионогенный детергент Tween-20, обладающий способностью блокировать связывание неспецифических иммуноглобулинов (0,05%); а также органическое соединение – многоатомный спирт этиленгликоль (5%), отличающийся свойством сохранять реакционно-активные карбонильные группы, что способствует стабилизации белков в водных растворах и, в конечном итоге, защищает

Таблица 1. Результат ИФА при изучении взаимодействия иммуноглобулинов сывороток жителей Российской Федерации с антигенами *B. pseudomallei*

ОП (о.е.)	0,01-0,1	0,101-0,2	0,201-0,25	0,251-0,3	0,301-2,0	≥2,01
M±σ*	0,096±0,004	0,156±0,031	0,234±0,015	0,272±0,018	0,561±0,370	2,085±0,038
Me	0,096	0,158	0,233	0,268	0,465	2,085
n (%)	2 (4,35%)	16 (34,78%)	5 (10,87)	6 (13,04%)	15 (32,61%)	2 (4,35%)
95% ДИ	(1,2-14,53)%	(22,68-49,23)%	(4,73-23,04)%	(6,12-25,67)%	(20,87-47,03)%	(1,2-14,53)%

Примечания: планшеты – *Medium Binding* (Costar); сенситин – антигенный комплекс *B. pseudomallei* 57576; блокирующий агент – 1% раствор бычьего сывороточного альбумина; исследуемые сыворотки разведены 1:100 в ФСБ-Tw. Результат представлен в виде среднего значения ОП ± стандартное отклонение (M±σ); ОП_{кк} 0,047. За фоновые (ложноположительные) принимали показатели ОП, превышающие среднее значение контролей конъюгата на 0,2 о.е.

Таблица 2. Результаты ИФА-тестирования взаимодействия мелиоидозных и нормальных мышинных сывороток с антигенным комплексом *B. pseudomallei* в зависимости от типа планшета, блокирующего агента и используемого для сенсибилизации буфера

Твёрдая фаза	Буфер для сенсибилизации	Блокирующий агент	Показатели ОП			Коэффициенты отношений показателей ОП		
			ММС 1:100	НМС 1:100	КК	ОП _{ММС} /ОП _{КК}	ОП _{НМС} /ОП _{КК}	К (К1/К2)
<i>Medium binding</i>	КББ pH 9,4	1% БСА	3,46±0,038	2,24±0,157	0,162	21,4	13,9	1,5
		2% БСА	3,31±0,018	2,01±0,113	0,181	18,4	11,1	1,6
		5% ЭТС	3,30±0,047	1,94±0,195	0,133	24,8	14,6	1,7
		1% ГРЧ	3,23±0,036	1,94±0,273	0,14	23,0	13,8	1,7
		5% СОМ	3,10±0,023	1,70±0,364	0,119	26,1	14,3	1,8
	ФСБ pH 7,4	1% БСА	2,98±0,086	1,27±0,065	0,114	26,2	11,2	2,3
		2% БСА	2,88±0,061	1,23±0,086	0,123	23,4	10,0	2,3
		5% ЭТС	2,93±0,062	1,25±0,244	0,097	30,2	12,9	2,3
		1% ГРЧ	2,97±0,004	1,70±0,324	0,145	20,5	11,7	1,7
		5% СОМ	2,95±0,042	1,24±0,032	0,103	28,7	12,0	2,4
<i>High binding</i>	КББ pH 9,4	1% БСА	3,50±0,040	2,52±0,095	0,213	16,5	11,8	1,4
		2% БСА	3,37±0,016	2,41±0,037	0,226	15,0	10,7	1,4
		5% ЭТС	3,30±0,034	2,35±0,005	0,136	24,2	17,3	1,4
		1% ГРЧ	3,25±0,059	2,24±0,009	0,131	24,9	17,2	1,4
		5% СОМ	2,94±0,075	1,38±0,025	0,097	30,4	14,3	2,1
	ФСБ pH 7,4	1% БСА	3,18±0,089	1,95±0,034	0,13	24,5	15,0	1,6
		2% БСА	3,16±0,077	1,91±0,047	0,142	22,3	13,5	1,7
		5% ЭТС	3,14±0,086	2,06±0,014	0,113	27,9	18,3	1,5
		1% ГРЧ	3,13±0,081	2,31±0,025	0,147	21,3	15,7	1,4
		5% СОМ	2,70±0,097	1,13±0,054	0,092	29,5	12,3	2,4
<i>Carbo-BIND</i>	АБ pH 5,5	1% БСА	2,25±0,332	0,67±0,036	0,085	26,5	7,9	3,4
		2% БСА	2,361±0,399	0,66±0,065	0,082	28,8	8,0	3,6
		5% ЭТС	2,633±0,493	0,732±0,057	0,084	31,3	8,7	3,6
		1% ГРЧ	2,162±0,415	0,626±0,048	0,081	26,7	7,7	3,5
		5% СОМ	2,219±0,452	0,586±0,068	0,075	29,6	7,8	3,8

Примечания:

*Сокращения: КББ – карбонат-бикарбонатный буфер; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; АБ – ацетатный буфер; БСА – бычий сывороточный альбумин; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ГРЧ – гидролизат рыбьей чешуи; СОМ – сухое обезжиренное молоко; ММС – мелиоидозная мышинная сыворотка; НМС – нормальная мышинная сыворотка; КК – контроль конъюгата; ОП – оптическая плотность лунок; ОП_{ММС}/ОП_{КК} и ОП_{НМС}/ОП_{КК} – соотношение показателей ОП в лунках с мелиоидозной и нормальной (соответственно) опытными образцами сывороток и контролем конъюгата; К1 – отношение показателей ОП в лунках, содержащих ММС и КК; К2 – отношение показателей ОП в лунках, содержащих НМС и КК; К – коэффициент отношения К1/К2;

**Сенситин – антигенный комплекс *B. pseudomallei* 57576;

***Сыворотки тестированы в разведении 1:100.

их от деградации. Использование МКБ однозначно продемонстрировало его преимущества при выполнении анализа как на пластинах с гидрофобно-ионным, так и ковалентным типами связывания (табл. 3).

Как следует из представленных данных, мелиоидозная мышиная сыворотка как в случае применения для её разведения фосфатно-солевого содержащего 0,05% твин-20 буфера, так и при использовании МКБ, в предлагаемых условиях проведения ИФА демонстрировала положительный результат реакции, что подтверждало её специфическую активность.

Результаты, полученные в ходе исследования нормальной мышиной сыворотки при её разведении и титровании в растворе ФСБ-Tw pH 7,4, однозначно должны быть расценены как ложноположительные, хотя по мере разведения образцов (соответственно от 1:800 на пластинах с гидрофобным связыванием сенситина (*Medium Binding*) и от 1:3200 и выше на твёрдой фазе, формирующей ковалентные связи (*Carbo-BIND*)) фоновые неспецифические взаимодействия были нивелированы.

Обращает на себя внимание, что при тестировании мелиоидозных мышиных сывороток, разведённых в МКБ до титра 1:12800, ковалентная

фиксация антигена на пластинах *Carbo-BIND* по сравнению с *Costar Medium Binding* приводила к более чем 4-кратному повышению показателей ОП в лунках, что, несмотря на получение более высоких титров изученных проб, в целом принципиально не меняло существа получаемых данных. При этом следует помнить, что в практической работе повышение чувствительности реакции, как правило, сопровождается снижением её специфичности, в связи с чем выбор типа планшет, с нашей точки зрения, определяется целями конкретного исследования.

В отличие от ФСБ-Tw, при разведении интактных сывороток на многокомпонентном Tris-HCl буфере (pH 8,0), содержащем этиленгликоль, бычий сывороточный альбумин, хлорид натрия и твин-20, во всех случаях результаты ИФА оказались отрицательными, что в полной мере доказывало специфичность предлагаемой аранжировки метода. По-видимому, все используемые ингредиенты в целом и каждый в частности способствуют снижению фоновых реакций и получению чётких и стабильных результатов ИФА.

В отработанной аранжировке далее было проведено ИФА-тестирование сывороток человека (табл. 4). Образцами служили как сыворотки, полученные от лиц, проживающих на территории

Таблица 3. Результаты непрямого ИФА* при изучении мелиоидозных и нормальных мышиных сывороток в зависимости от используемого для разведения образцов буфера

Планшет	Разведения сывороток	Показатели ОП				КК
		Мелиоидозная мышиная сыворотка		Нормальная мышиная сыворотка		
		ФСБ-Tw	МКБ	ФСБ-Tw	МКБ	
Medium Binding	1:100	2,83±0,468	1,589±0,104	0,949±0,311	0,048±0,001	0,044±0,005
	1:200	2,369±0,416	1,148±0,072	0,8±0,167	0,044±0,001	
	1:400	1,664±0,531	0,68±0,066	0,561±0,187	0,057±0,001	
	1:800	1,312±0,667	0,397±0,052	0,134±0,097	0,043±0,001	
	1:1600	1,168±0,724	0,31±0,047	0,07±0,028	0,044±0,005	
	1:3200	0,825±0,543	0,172±0,042	0,054±0,016	0,043±0,005	
	1:6400	0,437±0,276	0,118±0,037	0,046±0,002	0,038±0,005	
	1:12800	0,297±0,173	0,101±0,043	0,046±0,001	0,041±0	
Carbo-BIND	1:100	2,931±0,351	1,935±0,212	1,684±0,211	0,106±0,021	0,077±0,027
	1:200	2,680±0,404	1,739±0,159	1,399±242	0,061±0,01	
	1:400	2,369±0,340	1,575±0,137	0,718±0,117	0,069±0,042	
	1:800	2,208±0,721	1,324±0,082	0,552±0,034	0,049±0,001	
	1:1600	1,809±0,747	1,061±0,078	0,321±0,037	0,059±0,011	
	1:3200	1,394±0,628	0,775±0,067	0,205±0,062	0,068±0,006	
	1:6400	1,051±0,521	0,61±0,119	0,155±0,015	0,06±0,007	
	1:12800	0,828±0,296	0,43±0,092	0,111±0,025	0,057±0,006	

Примечания: *Параметры ИФА: сенситин – антигенный комплекс *B. pseudomallei* 57576; блокирующий агент – 5% раствор сухого обезжиренного молока; буферы для разведения образцов: ФСБ-Tw – фосфатно-солевой буфер, содержащий 0,05% Tween-20, pH 7,4; МКБ – многокомпонентный буфер pH 8,0; КК – ОП контроля конъюгата; За положительный результат (выделены жирным шрифтом) приняты показатели ОП, на 0,2 о.е. превышающие ОП контроля конъюгата (КК).

Таблица 4. Результат ИФА с использованием многокомпонентного Трис-НСI буфера для разведения образцов сывороток человека

ОП (о.е.)	0,01-0,1	0,101-0,2	0,201-0,25	0,251-0,3	0,301-2,0	≥2,01
М±σ	0,078±0,01	0,129±0,027	0,223±0,013	0,283	0,314	2,299
Me	0,076	0,122	0,222	0,283	0,314	2,299
n (%)	16 (34,78%)	21 (45,65%)	6 (13,04%)	1 (2,17%)	1 (2,17%)	1 (2,17%)
95% ДИ	(22,68-49,23)	(32,15-59,82)	(6,12-25,67)	(0,38-11,33)	(0,38-11,33)	(0,38-11,33)

Примечания:

*планшеты *Medium Binding*, сенситин – антигенный комплекс *B. pseudomallei* 57576; буфер для сенсibilизации – ФСБ pH 7,4; блокирующий свободные поверхности лунок реагент – 5% раствор сухого обезжиренного молока; контроль конъюгата при выполнении ИФА (КК) = 0,052;

**Данные ИФА по изучению взаимодействия иммуноглобулинов сывороток жителей РФ с антигенами *B. pseudomallei* при использовании для разведения образцов ФСБ pH 7,4 представлены в таблице 1.

России (n=46), в которых определяли присутствие пулов перекрёстно-реагирующих с антигенами *B. pseudomallei* антител, так и случайно отобранные пробы от клинически здоровых жителей эндемичного региона (n=46), которые потенциально могли содержать специфические мелиоидозные иммуноглобулины – возможно, вследствие бытового контакта с объектами окружающей природной среды или в результате перенесённого ранее заболевания [17].

Для разведения сывороток использовали как ФСБ-Tw pH 7,4, так и многокомпонентный буфер на основе Трис-НСI pH 8,0 (МКБ). Преимущества предлагаемого многокомпонентного буфера отчётливо представлены на моделях сывороток лиц (n=46), проживающих вне эндемичной зоны и потому *a priori* являющимися отрицательными контролями при выявлении случаев мелиоидоза (табл. 4).

При показателе ОП в лунках с контролем конъюгата 0,052 значения ОП интактных сывороток выше 0,25 должны быть расценены как ложноположительные и фоновые.

Как оказалось, при использовании МКБ из 46 проб сывороток условно здорового населения, проживающего вне эндемичной зоны и потенциально не имеющего в своём составе пулов мелиоидозных иммуноглобулинов, в 43 случаях (93,48%) в ИФА получен отрицательный результат. Единичные случаи, при которых ОП в лунках составляла значения более 0,25 (показатель, превышающий ОП_{КК} на 0,2 о.е.) – соответственно 0,283, 0,314 и более 2 о.е., – с нашей точки зрения, являются исключениями, подтверждающими правило. Такие наблюдения могут быть связаны с анамнестически перенесённой инфекцией, вызванной иммуногенными близкородственными возбудителями, у которых на поверхности клетки экспонированы перекрёстно-реагирующие антигенные комплексы, включающие, например,

О-цепи липополисахарида грам-отрицательных бактерий, распространённых на территории нашей страны (таких, как *P. aeruginosa* и др.).

При использовании ФСБ «отрицательные» и «положительные» значения ОП лунок, куда были внесены образцы интактных сывороток человека, составили пропорцию 1:1, что, несомненно, не только существенным образом отличалось от данных, полученных при внедрении в протокол ИФА предлагаемого раствора МКБ, но и статистически достоверно демонстрировало преимущества последнего (p<0,0001).

В соответствии с отработанными параметрами ИФА в дальнейшем было проведено сравнительное тестирование сывороток, полученных от лиц из эндемичного и неэндемичного регионов (рис. 1).

Как следует из представленных данных, в результате проведения ИФА в предлагаемом варианте были получены статистически достоверные отличия в показателях ОП (0,178±0,325) и ((0,661±0,454) соответственно) при тестировании сывороток лиц, проживающих вне эндемичного

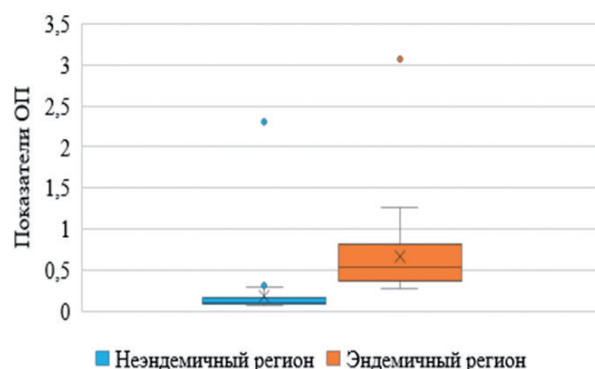


Рис. 1. Сравнение результатов ИФА-тестирования сывороток, полученных от лиц, проживающих в неэндемичном и эндемичном по мелиоидозу регионах соответственно

региона (на рисунке слева) и в зоне эндемичного распространения мелиоидоза (на рисунке справа) ($p < 0,0001$).

Вероятно, население, проживающее в зоне природных очагов мелиоидоза, может накапливать в своих сыворотках пулы специфических антител вследствие перенесённой инфекции, естественных контактов с возбудителем в случае размывания почвенных резервуаров в сезоны дождей или при таких природных катаклизмах, как цунами или тайфуны, а также в ходе выполнения местными жителями сельскохозяйственных работ или другого вида деятельности. Не исключено взаимодействие с близкородственными перекрёстно-реагирующими микроорганизмами,

занимающими те же, что и *B. pseudomallei*, экологические ниши, например, буркхольдериями *Burkholderia cepacia complex*. С нашей точки зрения, эти факты могут служить основанием для регистрации более высокого уровня ОП в лунках с исследуемыми пробами и более широкого диапазона этих показателей.

Таким образом, в целом, ключевые параметры ИФА-тест-системы, обеспечивающие специфическое выявление сывороточных мелиоидозных антител в случае необходимости в экспресс-режиме верифицировать диагноз мелиоидоза, с нашей точки зрения, подобраны, и предлагаемая аранжировка ИФА помогает получить специфичные и достоверные результаты исследования.

Литература

1. Meumann EM, Limmathurtsakul D, Dunachie SJ, et al. *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis. *Nat Rev Microbiol*. 2024;22(3):155-169. doi:10.1038/s41579-023-00972-5.
2. Norman FF, Chen LH. Travel-associated melioidosis: a narrative review. *J Travel Med*. 2023;30(3):taad039. doi:10.1093/jtm/taad039.
3. Балахонов С.В., Дугаржапова З.Ф., Таликина Т.О., и др. Завозной случай лабораторно подтвержденного мелиоидоза в России. Актуальные вопросы санитарной охраны территории и снижения рисков распространения чумы и других опасных инфекционных болезней : материалы XVII Межгосударственной научно-практической конференции, 8–9 октября 2024 г., Иркутск / под ред. А. Ю. Поповой, С. В. Балахонова. Иркутск: Издательство ИГУ, 2024.
4. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol*. 2023;2612:1-17. doi:10.1007/978-1-0716-2903-1_1.
5. Терешко Д.Л., Рябинина Л.А., Коскина Я.В., и др. Выявление специфических антител как аспект иммунодиагностики особо опасных инфекций. Сб. материалов Первой Российско-Африканской международной конференции по борьбе с инфекционными болезнями (17–19 апреля 2024 г., Кампала, Республика Уганда) / под ред. А.Ю. Поповой, В.В. Кутырева. Саратов: Амирит, 2024.
6. Suttisunhakul V, Wuthiekanun V, Brett PJ, et al. Development of Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1259-1268. doi:10.1128/JCM.02856-15.
7. Win ZZ, Phokrai P, Aung Z, et al. Use of Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Serological Screening of Melioidosis in Myanmar. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(5):1300-1302. doi:10.4269/ajtmh.17-0791.
8. Syed I, Wooten RM. Interactions Between Pathogenic *Burkholderia* and the Complement System: A Review of Potential Immune Evasion Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:701362. Published 2021 Sep 30. doi:10.3389/fcimb.2021.701362.
9. Seo YS, Lim JY, Park J, et al. Comparative genome analysis of rice-pathogenic *Burkholderia* provides insight into capacity to adapt to different environments and hosts. *BMC Genomics*. 2015;16(1):349. Published 2015 May 6. doi:10.1186/s12864-015-1558-5.
10. Rongkard P, Kronsteiner B, Hantrakun V, et al. Human Immune Responses to Melioidosis and Cross-Reactivity to Low-Virulence *Burkholderia* Species, Thailand1. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(3):463-471. doi:10.3201/eid2603.190206.
11. Yi J, Simpanya MF, Settles EW, et al. Caprine humoral response to *Burkholderia pseudomallei* antigens during acute melioidosis from aerosol exposure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(2):e0006851. Published 2019 Feb 27. doi:10.1371/journal.pntd.0006851.
12. Noparatvarakorn C, Sengyee S, Yarasai A, et al. Prospective Analysis of Antibody Diagnostic Tests and TTS1 Real-Time PCR for Diagnosis of Melioidosis in Areas Where It Is Endemic. *J Clin Microbiol*. 2023;61(3):e0160522. doi:10.1128/jcm.01605-22.
13. Gibbs J, Vessels M., Rothenberg M., et al. Immobilization Principles—Selecting the Surface for ELISA Assays, 2017.
14. Minic R., Zivkovic I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. *IntechOpen*. 2021. doi: 10.5772/intechopen.94338.
15. Gibbs J, Vessels M., Rothenberg M., et al. Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules for ELISA Assays. Application Note, Corning Inc., Kennebunk, USA. 2017.
16. Gibbs J, Vessels M., Rothenberg M. Effective blocking procedures in ELISA assays. Application note //Effective Blocking Procedures in ELISA assays, Application Note. 2017.
17. Jilani MS, Robayet JA, Mohiuddin M, et al. *Burkholderia pseudomallei*: Its Detection in Soil and Seroprevalence in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004301. Published 2016 Jan 15. doi:10.1371/journal.pntd.0004301.

Сведения об авторах

Новицкая Ирина Вячеславовна — к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, зав. отделом иммунологии и экспериментального производства МИБП ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: irnov@mail.ru. ORCID: 0000-0001-8124-0310.

Терешко Дмитрий Леонидович научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: dtereshko@gmail.com. ORCID: 0000-0002-5876-1270.

Печёнкина Любовь Анатольевна научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. E-mail: lyubov-vmu@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-7912-6145.

Поступила 03.06.2026.