



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007120082/15, 29.05.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.05.2007

(45) Опубликовано: 27.11.2008 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CHART H, CHEASTY T The serodiagnosis of human infections with Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis, FEMS Immunol Med Microbiol. 2006 Aug; 47(3):391-7, PMID: 16872375 [PubMed - indexed for MEDLINE]. RU 2153172 C1, 02.12.1998. RU 2101342 C1, 10.01.1998. ПОРТНЯГИНА О.Ю. и др. Бактериальные порины как перспективные антигены для (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, патентный
отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Вострикова Ольга Павловна (RU),
Портнягина Ольга Юрьевна (RU),
Малашенкова Владлена Георгиевна (RU),
Хоменко Валентина Александровна (RU),
Новикова Ольга Данииловна (RU),
Гордеец Альвина Васильевна (RU),
Соловьева Тамара Федоровна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

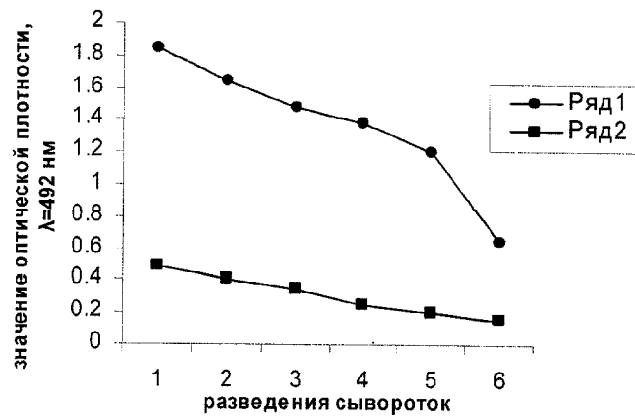
Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU),
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Владивостокский государственный медицинский
университет Федерального агентства по
здравоохранению и социальному развитию"
(ГОУ ВПО ВГМУ Росздрава) (RU)

(54) СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА И КИШЕЧНОГО ИЕРСИНИОЗА И ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к способу серологической диагностики иерсиниозов (псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза), вызываемых Yersinia pseudotuberculosis и Yersinia enterocolitica. Способ основан на определении специфических антител к возбудителям заболеваний в сыворотке крови больного методом твердофазного иммуноферментного анализа, где в качестве антигенов используются одновременно два видоспецифических порообразующих белка наружной мембраны (НМ) Y. pseudotuberculosis и из Y. enterocolitica. За диагностические титры в ИФА приняты разведения сывороток 1:800 для порина ИМ Y. pseudotuberculosis и 1:1600 для порина НМ

Y. enterocolitica. Диагностический набор на псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз содержит планшет с иммобилизованными антигенами - видоспецифическими белками-поринами наружной мембраны Y. pseudotuberculosis и Y. enterocolitica, образцы контрольных (положительной и отрицательной) сывороток крови и вторых общевидовых антител, емкости с готовыми для употребления инактивирующим и стоп-реагентами, субстратом и буферными системами. Использование способа позволяет проводить дифференциальную диагностику псевдотуберкулеза от кишечного иерсиниоза и выявлять случаи смешанной формы иерсиниозной инфекции. 2 н.п. ф-лы, 3 ил.



Определение уровня антител к порину из *Y. enterocolitica* в сыворотках крови больных иерсиниозом с подтвержденным диагнозом (ряд 1) и здоровых людей (ряд 2) при различных разведениях (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 — точки 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответственно) с помощью ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica*.

Фиг. 1

(56) (продолжение):

диагностики и вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний. Вестник ДВО РАН, 2004, №3, с.35-44.
 НОВИКОВА О.Д. и др. Использование порина из внешней мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* для серодиагностики псевдотуберкулеза. Бюлл. эксп. биол. мед., 2005, №8, с.199-202.

RU 2 3 3 9 9 5 2 C 1

RU 2 3 3 9 9 5 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2007120082/15, 29.05.2007**(24) Effective date for property rights: **29.05.2007**(45) Date of publication: **27.11.2008 Bull. 33**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoku, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Vostrikova Ol'ga Pavlovna (RU),
Portnjagina Ol'ga Jur'evna (RU),
Malashenkova Vladlena Georgievna (RU),
Khomenko Valentina Aleksandrovna (RU),
Novikova Ol'ga Daniilovna (RU),
Gordeets Al'vina Vasil'evna (RU),
Solov'eva Tamara Fedorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj
khimii Dal'nevostochnogo otdelenija
Rossijskoj akademii nauk (TIBOKh DVO RAN)**

(RU),

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovaniya
"Vladivostokskij gosudarstvennyj meditsinskij
universitet Federal'nogo agentstva po
zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju"
(GOU VPO VGMU Roszdrava) (RU)**

(54) **METHOD FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTICS OF PSEUDO-TUBERCULOSIS AND INTESTINAL YERSINIOSIS AND DIAGNOSTIC SET FOR ITS REALISATION**

(57) Abstract:

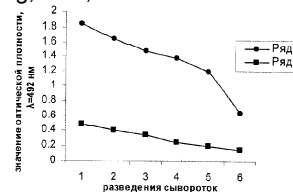
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: determine specific antibodies to activators of diseases in blood serum of the patient using the method of solidphase enzyme multiplied immunoassay where as antigens are used in one stage two species-specific pore-forming proteins outside membranes (NM) *Y. pseudotuberculosis* and from *Y. enterocolitica*. As diagnostic titres in EIA delutions of serum 1:800 for porin NM are accepted. *pseudotuberculosis* and 1:1600 for porin NM *Y. enterocolitica*. The diagnostic set on a *pseudotuberculosis* and intestinal yersiniosis contains a tablet with the immobilized antigens - species-specific proteins-porins of external membrane *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*, samples control (positive and negative) blood sera and the second common-

species antibodies, capacity with ready for the use inactivating and stop reagents, substrate and buffer systems.

EFFECT: possibility to carry out differential diagnostics of pseudotuberculosis from intestinal yersiniosis and to tap cases of the admixed form of yersuniosal infection.

3 dwg, 1 ex, 2 cl



Определение уровня антител к порину из *Y. enterocolitica* в сыворотках крови больных иерсиниозом с подтвержденным диагнозом (ряд 1) и здоровых людей (ряд 2) при различных разведениях (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 — точки 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответственно) с помощью ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica*.

Фиг. 1

Изобретение относится к области медицины, в частности к способу серологической диагностики иерсиниозов (псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза).

Иерсиниозные инфекции, вызываемые патогенными для человека *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, относятся к широко распространенным в мире острым кишечным заболеваниям. Этиологическое родство возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза способствует определенному сходству этих инфекционных заболеваний. Иерсиниозы характеризуются подобием клинических форм и проявляются как в виде первично-очаговых форм (генерализованная, кишечная, абдоминальная и смешанная, ангинозная, острая респираторная, но и более редкая - кожная), так и в виде вторично-очаговых форм иерсиниозов (пневмонической, гепатитной, менинго-энцефалитической, септической и др.). При этом принципиальных различий в клинических признаках этих форм иерсиниозной инфекции в зависимости от вида возбудителя (*Y. pseudotuberculosis* или *Y. enterocolitica*) не выявлено [1-3]. При постановке первичного диагноза «иерсиниоз» практикующие врачи ориентируются, как правило, на клинические проявления заболевания. Псевдотуберкулез (ПСТ), например, характеризуется большей выраженностью токсико-аллергического синдрома, а кишечный иерсиниоз (КИ) - дисфункцией ЖКТ и органами поражениями [1-3]. Однако подобные различия в клинических признаках между ПСТ и КИ четко прослеживаются только при массовом проведении анализа и мало помогают в дифференциальной диагностике в каждом конкретном случае. В связи с этим установление этиологического диагноза при иерсиниозах только по его клиническим проявлениям особенно в ранние сроки и при спорадической заболеваемости практически невозможно [1-3]. Особенно часто диагностические ошибки возможны у детей раннего возраста, а также при тяжелой форме заболевания. Однако и при более легком течении инфекции у детей старшего возраста поставить правильный диагноз с учетом этиологии заболевания не удастся без результатов лабораторного обследования [2]. Сложность верификации ПСТ от КИ только по клиническим проявлениям в большинстве случаев нередко приводит к ошибочному диагнозу, даже при типичном течении заболевания. Особую сложность при диагностике иерсиниозной инфекции в зависимости от этиологии возбудителя представляют случаи смешанной формы иерсиниозов, обусловленной одновременно *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. В связи с этим особую значимость при дифференциации обобщенного диагноза «иерсиниоз» (ПСТ и/или КИ) приобретает необходимость четкого разграничения данных инфекций при вспышечной заболеваемости, когда необходимы масштабные противоэпидемические мероприятия, с учетом некоторых различий в механизме передачи возбудителей ПСТ и КИ. Окончательный диагноз возможен только с использованием лабораторных методов обследования пациента. В соответствии с инструктивными документами [4] большое значение уделяется серологическим методам диагностики, направленным на выявление специфических антител к возбудителям иерсиниозов - *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Результаты исследования крови больных на наличие антител к определенному виду возбудителя позволяют ориентировать клинициста в тактике ведения больного и в определенной степени прогнозировать течение заболевания.

Используемые в практике лечебных учреждений серологические методы, основанные на реакции агглютинации (РА), разработаны для диагностики как ПСТ, так и КИ и обеспечивают верификацию либо ПСТ, либо - КИ [5, 6]. В связи с этим дифференциальная диагностика иерсиниозов с учетом этиологии требует последовательного использования различных типоспецифических диагностикумов: сначала для определения специфических антител к *Y. pseudotuberculosis*, затем - к *Y. enterocolitica*. Подобная схема анализа проводится поэтапно: для выявления антител к иерсиниям вначале ставят развернутую реакцию с диагностикумами к наиболее часто встречающимся сероварам *Y. pseudotuberculosis* (1 В) или к *Y. enterocolitica* (0:9 и 0:3). Затем, если возникнет в этом необходимость, РА ставят с диагностикумами к другим серовариантам *Y. pseudotuberculosis* (III, IV) или *Y. enterocolitica* (0:5,27, 0:8, 0:6 и др.). Таким

образом, предлагаемая схема серологической диагностики иерсиниозов многоэтапна, трудоемка и длительна. Кроме того, поскольку в качестве антигена в РА используются живые культуры иерсиний, а реакция типоспецифическая, то необходимо иметь культуры иерсиний разных серологических вариантов, наиболее часто вызывающих заболевания. К недостаткам методов можно отнести также ретроспективность результатов анализа, так как антитела в диагностических титрах выявляются только на 2-3 неделях болезни.

Способы диагностики иерсиниозов, основанные на реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), разработаны для диагностики как ПСТ, так и для - КИ. Несмотря на определенные успехи по усовершенствованию этих диагностикумов, что позволило наладить их промышленный выпуск, они имеют также существенные недостатки [7, 8]. Предлагаемые способы характеризуются невысокой специфичностью, поскольку в реакции используются типоспецифические антигены - липополисахариды *Y. pseudotuberculosis* 1В и *Y. enterocolitica* 0:3 и 0:9 серовариантов, что не позволяет выявлять случаи заболеваний, вызванных другими серовариантами этих микроорганизмов. Кроме того, общепринятый многостадийный подход к диагностике иерсиниозов без учета этиологии возбудителя отличается длительностью анализа, перерасходом сыворотки крови больного, необходимых реагентов, материалов и др.

Для диагностики иерсиниозов в последние годы интенсивно разрабатывается иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием антигенов различной природы [9-12], однако предлагаемые варианты ИФА не позволяют проводить одновременно дифференцирование ПСТ и КИ, а требуют поэтапного их использования, больших затрат времени и необходимых материалов.

Предложен способ диагностики иерсиниозов с помощью ИФА на основе протеинового антигена, свободно секретируемого в культивируемую среду разными видами иерсиний, в частности *Y. pseudotuberculosis* 1В сероварианта [12]. Однако этот способ не обеспечивает дифференциальной диагностики иерсиниозов с учетом этиологии возбудителя.

Известен способ дифференциальной диагностики иерсиниозов с использованием в ИФА типоспецифического антигена - липополисахарида (ЛИС) из *Y. pseudotuberculosis* 1 В сероварианта или ЛПС из *Y. enterocolitica* 0:3 и 0:9 серотипов [13]. Однако предлагаемый метод ввиду его типоспецифичности не позволяет диагностировать заболевания, вызванные *Y. pseudotuberculosis* II, III, IV серовариантами, и *Y. enterocolitica* 0:5, 0:6, 0:7, 0:8 и других серотипов. Кроме того, для верификации ПСТ от КИ необходимо поэтапное использование типоспецифических диагностикумов, например, сначала на ПСТ, затем - на КИ. Для проведения такого анализа требуются очищенные антигены из различных серологических вариантов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, на получение которых затрачивается значительное время, что усложняет диагностику.

Этот способ включает следующие этапы:

- 1) посадка антигена на полистироловый планшет, в качестве антигена используется инактивированный корпускулярный антиген из *Y. enterocolitica* 0:3 и 0:9 серовариантов;
- 2) отмывка планшета;
- 3) нанесение исследуемой сыворотки в диагностическом разведении;
- 4) отмывка планшета;
- 5) нанесение конъюгата;
- 6) отмывка планшета;
- 7) нанесение субстратной смеси;
- 8) регистрация результатов реакции.

В настоящее время промышленный выпуск иммуноферментных диагностикумов (ИФА тест-систем) на иерсиниозы в нашей стране не осуществляется. Методы дифференциальной диагностики иерсиниозов, предлагаемые разными авторами [9-12], не оснащены необходимыми наборами реагентов для проведения иммунодиагностики иерсиниоза.

Предлагаемые ИФА тест-системы характеризуются невысокой специфичностью и чувствительностью к выявлению иерсиниозов, обусловленных разными серологическими вариантами *Y. pseudotuberculosis* (II, III, IV) и *Y. enterocolitica* (0:5, 0:6, 0:7, 0:8 и другие), наиболее часто вызывающих заболевания, и не обеспечивают

5 дифференциальной диагностики иерсиниозов в зависимости от этиологии возбудителя.

Задача изобретения - совершенствование дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза за счет одновременного определения этих инфекций, вызываемых разными серологическими вариантами возбудителей иерсиниозов, и разработка диагностического набора.

10 В результате решения поставленной задачи разработан способ дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, включающий определение специфических антител к возбудителям в сыворотке крови больного методом твердофазного иммуноферментного анализа, предусматривающего нанесение антигенов на планшеты, в котором согласно изобретению на одну половину планшета наносят видоспецифический белок-порин наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, за
15 диагностический титр принимают разведение сыворотки 1:800, а на другую половину планшета наносят видоспецифический белок-порин наружной мембраны *Yersinia enterocolitica*, за диагностический титр принимают разведение сыворотки 1:1600 и верификацию псевдотуберкулеза от кишечного иерсиниоза осуществляют сравнением значений оптической плотности раствора реакций сыворотки крови больного с антигенами из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) и из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$), при величине отношения $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ больше или равной 2,0 диагностируют псевдотуберкулез, при величине отношения $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ больше или равной 2,0 диагностируют кишечный иерсиниоз, при величинах отношений $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ и $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ близких или равных 1,0,
20 диагностируют смешанную форму иерсиниозной инфекции.

Диагностический набор на псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз содержит планшет с иммобилизованными антигенами - видоспецифическими белками-поринами наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, образцы контрольных (положительной и отрицательной) сывороток крови и вторых общевидовых антител,
30 емкости с готовыми для употребления инактивирующим и стоп-реагентами, субстратом и буферными системами.

Технический результат, обеспечиваемый группой изобретений, заключается в повышении специфичности и чувствительности иммуноферментной диагностики иерсиниозов. Заявляемый способ позволяет проводить дифференциальную диагностику
35 псевдотуберкулеза от кишечного иерсиниоза и выявлять случаи смешанной формы иерсиниозной инфекции, обусловленной одновременно *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Способ является более простым, т.к. обеспечивает одномоментное проведение системного анализа из одного образца сыворотки крови больного на иерсиниоз с учетом этиологии возбудителя, что улучшает иммунодиагностику иерсиниозов, сокращает
40 время проведения и стоимость анализа.

Порообразующие белки наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий являются иммунологическими маркерами, характерными для вида или рода микроорганизмов, и относятся к высокоиммуногенным компонентам бактериальной клетки, и определение антител к ним используется для диагностики инфекционных заболеваний
45 [14].

Авторы заявляемого способа установили, что порины из НМ *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* являются видоспецифическими антигенами возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, антитела к которым обнаруживаются независимо от серологического варианта возбудителей как в антисыворотках лабораторных животных,
50 иммунизированных лизатами клеток *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, так и в сыворотках крови больных псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом.

Способ осуществляется следующим образом: диагностику проводят по методике выявления специфических антител к возбудителям в сыворотке крови больного, используя

стандартный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА, непрямой, неконкурентный анализ антител) [15]. В качестве антигенов используются одновременно два видоспецифических порообразующих белка из *HM Y. pseudotuberculosis* и из *HM Y. enterocolitica*, выделенных в одинаковых условиях и по одной методике [16].

5 За диагностические титры в ИФА приняты разведения сывороток 1:800 для порина *HM Y. pseudotuberculosis* (согласно патенту RU №2153172 C1, 20.07.2000) и 1:1600 для порина *HM Y. enterocolitica*.

10 Диагностический титр в ИФА тест-системе на основе порина из *Y. enterocolitica* определяли, сравнивая статистически достоверные значения [17], равные отношениям значений оптической плотности раствора реакций сывороток крови больных иерсиниозом с бактериологически подтвержденным диагнозом и здоровых людей ($P_{оп}/P_{зд}$) при различных разведениях, где $F_{оп} = F_c + F_{ф}$

15 F_c - значение оптической плотности раствора специфической реакции антиген/антитело (антитела - сыворотка крови больного с подтвержденным диагнозом, или положительный контроль),

$F_{зд}$ - значение оптической плотности раствора реакции с сывороткой крови здорового донора, или отрицательный контроль,

$F_{ф}$ - значение оптической плотности раствора неспецифической фоновой реакции.

20 Для исследуемых сывороток (57 сывороток крови больных с бактериологически подтвержденным диагнозом и 86 доноров) в разведениях 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 эти величины оказались соответственно равны 3,6; 4,0; 4,2; 5,5; 5,0; 4,1 (фиг.1). За диагностический титр приняли разведение сыворотки, для которого соотношение $F_{оп}/F_{зд}$ оказалось наибольшим. Таким образом, в ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica* за диагностический титр принято разведение 1:800-1:1600. Анализ

25 сывороток крови больных иерсиниозом с помощью данной тест-системы на основе порина показал, что уровень специфических антител зарегистрирован в пределах 0,64-2,0 единиц оптической плотности раствора ферментативной реакции, что достоверно отличалось от контрольных значений (0,1-0,3 единиц оптической плотности раствора реакции).

30 Для подтверждения специфичности и чувствительности ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica* нами было обследовано 657 сывороток крови больных с характерными клиническими признаками иерсиниоза (357 детей в возрасте от 1 года до 14 лет и 200 сывороток крови взрослых пациентов). Кроме того, учитывая полиморфизм иерсиниозной инфекции, были проанализированы 256 сывороток крови больных с острыми кишечными инфекциями, не обусловленных *Y. enterocolitica* (псевдотуберкулез - 134,

35 сальмонеллез - 54, острые вирусные гепатиты (А и В) - 68). Верификация указанных заболеваний проводилась с учетом клинико-эпидемиологических, бактериологических и/или специфических серологических исследований. Контрольную группу составили 86 практически здоровых человек, сопоставимых по возрасту и полу с обследуемыми больными.

40 В результате анализа было обнаружено, что сыворотки крови больных псевдотуберкулезом и сальмонеллезом в диагностическом титре (1:800) взаимодействуют с порином. Однако значения оптической плотности раствора реакции этих сывороток в 2-3 раза меньше значения оптической плотности раствора при взаимодействии порина с сыворотками крови больных иерсиниозом. При разведении этих сывороток 1:1600 -

45 антитела к порину из *Y. enterocolitica* были определены на уровне отрицательного контроля. При анализе сывороток крови больных гепатитами антител к порину из *Y. enterocolitica* не обнаружено ни в одном из случаев (фиг.2). Следовательно, разведение сывороток крови 1:1600 в большей степени соответствует диагностическому титру в ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica* при верификации кишечного иерсиниоза.

50 Полученные результаты свидетельствует о том, что предлагаемая тест-система позволяет эффективно и достоверно осуществлять дифференциальную диагностику иерсиниоза от других острых кишечных заболеваний. Следовательно, ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica* является чувствительным методом диагностики иерсиниоза, обладает

высокой специфичностью и не дает перекрестных реакций с антителами к возбудителям заболеваний, сходных по клинике с иерсиниозом.

Для осуществления дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза полистироловый 96-луночный планшет («Dynatech», Швейцария или «Costar», США) сенсibiliзируют антигенами, на одну половину планшета наносят видоспецифический белок-порин *Y. pseudotuberculosis*, а на другую половину планшета - видоспецифический белок-порин *Y. enterocolitica* и проводят анализ по стандартной методике.

Анализ состоит из следующих этапов:

- 1) посадка антигенов на твердый носитель (96 луночный полистироловый планшет) (концентрация каждого антигена - 5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9.0);
- 2) отмывка планшета от несвязавшихся компонентов 3-5 раз по 5 мин буфером "B", состоящим из фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (буфер "A") + 0,05% твин-20 (или твин-80);
- 3) инактивация планшета (предотвращение неспецифического связывания антигена с антителами) буфером "C", состоящим из фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (буфер "A") + 0,1% твин-20;
- 4) нанесение исследуемой сыворотки в двух параллелях с каждым из антигенов в диагностических разведениях (1:800 для порина из *Y. pseudotuberculosis* и 1:1600 для порина из *Y. enterocolitica*) готовится с использованием буфера "B";
- 5) отмывка планшета;
- 6) нанесение конъюгата (вторые общевидовые антитела, меченные пероксидазой хрена): рабочее разведение (1:1000) готовится в буфере "C";
- 7) отмывка планшета;
- 8) нанесение субстрат-индикаторного раствора: 0.04% о-фенилендиамин в цитратно-фосфатном буфере (pH 5.0) + 10 мкл 33% H_2O_2 (в расчете на 10 мл буфера);
- 9) нанесение стоп-реагента: 0,5M раствор серной кислоты (H_2SO_4) готовится при разбавлении 1 мл концентрированной H_2SO_4 в 15 мл дистиллированной воды;
- 10) регистрация результатов реакции.

Для исследования диагностических качеств и специфичности предлагаемой ИФА тест-системы на основе поринов из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* обследовано 194 больных в возрасте от 1 года до 14 лет; из них - 146 больных иерсиниозом и псевдотуберкулезом, 48 больных - с этиологически расшифрованной кишечной инфекцией (сальмонеллез). Диагностика указанных заболеваний проводилась с учетом клинико-эпидемиологических, бактериологических и/или специфических серологических исследований. Контрольную группу составили 27 практически здоровых человек, сопоставимых по возрасту и полу с обследуемыми больными.

С помощью ИФА на основе поринов из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* при анализе сывороток крови больных с первичным диагнозом «иерсиниоз» установлено, что сыворотки крови больных иерсиниозами взаимодействуют в диагностических титрах (1:800 для ПСТ и 1:1600 для КИ) с поринами из обоих микроорганизмов.

При сравнении статистически достоверных средних значений оптической плотности раствора положительных реакций с использованием обоих антигенов [17] в 73% случаев установлено, что значения оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) в 2 раза больше подобного показателя реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) ($ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} > 2,0$), что подтверждает этиологию заболевания, вызванного *Y. enterocolitica* (фиг.1а). В 22,3% случаев установлено, что значение оптической плотности раствора в реакции сывороток крови в диагностическом титре (1:800) с порином из *Y. pseudotuberculosis* в 2 раза больше подобного показателя реакции при взаимодействии этих же сывороток в диагностическом титре (1:1600) с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} > 2,0$), что подтверждает этиологию псевдотуберкулезной инфекции (фиг.1б). В 4,7% случаев с помощью ИФА тест-системы была обнаружена смешанная форма иерсиниозной инфекции. Так, при взаимодействии сывороток (в диагностическом титре 1:800) с порином из *Y. pseudotuberculosis* значение оптической

плотности раствора в реакции было близким (или равным) значению оптической плотности раствора реакции при взаимодействии этих же сывороток (в разведении 1:1600) с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.ps.} = ОП_{Y.e.}$) (фиг. 1в). В случае сывороток крови больных сальмонеллезом в диагностических титрах (1:800 для ПТБ и 1:1600 для КИ) положительных реакций в ИФА с поринами иерсиний обнаружено не было.

Таким образом, предлагаемая ИФА тест-система на основе поринов *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* является высокоспецифичным, эффективным и чувствительным методом, позволяющим дифференцировать иерсиниоз от псевдотуберкулеза и выявлять смешанные формы иерсиниозной инфекции, обусловленные одновременно *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

Изобретение иллюстрируется следующими чертежами:

На фиг.1 представлено определение уровня специфических антител к порину из *Y. enterocolitica* в сыворотках крови больных иерсиниозом с подтвержденным диагнозом (ряд 1) и здоровых людей (ряд 2) при различных разведениях (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 - точки 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответственно) с помощью ИФА на основе порина из *Y. enterocolitica*.

На фиг.2 представлен анализ сывороток крови больных (сальмонеллезом, иерсиниозом, псевдотуберкулезом, гепатитами) и доноров в разведении 1:800 (ряды 1, 2, 3, 4, 5) и 1:1600 (ряды 7, 8, 9, 10, 11) с помощью ИФА тест-системы на основе порина из *Y. enterocolitica*.

На фиг.3 (а, б, в) представлено определение антител к поринам *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в сыворотках крови больных псевдотуберкулезом (ПСТ) и кишечным иерсиниозом (КИ) с помощью ИФА с учетом этиологии заболевания: 1 - ПСТ (разведение сыворотки 1:800), 2 - КИ (разведение сыворотки 1:1600):

а) верификация кишечного иерсиниоза: среднее значение оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) в 2 раза больше среднего значения оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) - $ОП_{Y.ps.} > 2,0$;

б) верификация псевдотуберкулеза: среднее значение оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) в 2 раза больше среднего значения оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) - $ОП_{Y.ps.} / ОП_{Y.e.} > 2,0$;

в) верификация смешанной формы иерсиниозной инфекции: среднее значение оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) равно (или близко) среднему значению оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) - $ОП_{Y.e.} = ОП_{Y.ps.}$, а $ОП_{Y.e.} / ОП_{Y.ps.}$ и $ОП_{Y.ps.} / ОП_{Y.e.}$ близки или равны 1,0.

Изобретение иллюстрируется следующим примером:

Полистироловый планшет (96-луночный полистироловый планшет фирмы «Dynatech», Швейцария или «Costar», США) сенсibiliзируют антигенами, на одну половину планшета наносят видоспецифический белок-порин *Y. pseudotuberculosis*, а на другую половину планшета - видоспецифический белок-порин *Y. enterocolitica* в концентрации 5 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере с pH 9.0 каждого из антигенов и выдерживают при 37°C в течение - 2 час. Далее содержимое лунок удаляют сильным встряхиванием, и планшет промывают 3 раза буфером "В", состоящим из 0,02 М фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (буфер "А") + 0,05% твин-20. Буфер "А" содержит: 5,68 г Na_2HPO_4 + 6,24 г NaH_2PO_4 + 11,2 г $NaCl$ + 2 л H_2O . При каждой стадии промывки планшета необходимо тщательно удалять остатки влаги из лунок постукиванием перевернутого планшета о фильтровальную бумагу.

Затем в каждую лунку планшета вносят по 300 мкл буфера "С", состоящего из фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (буфер "А") + 0,1% твин-20, и планшет инактивируют в течение 16-18 часов при 4°C. После удаления инактивирующего раствора, в лунки планшета по два повтора для каждого антигена вносят по 100 мкл исследуемой сыворотки крови, положительных и отрицательных контролей в диагностических титрах,

определенных для каждого антигена: 1:800 - для порина из *Y. pseudotuberculosis* и 1:1600 - для порина из *Y. enterocolitica*. Исследуемые сыворотки крови больных, положительные и отрицательные контроли разводят буфером "В". Планшет инкубируют 2 ч при 37°C, затем отмывают 3-5 раз по 5 мин от несвязавшихся компонентов буфером "В",

5 тщательно удаляя остатки влаги из лунок.

Затем в каждую лунку планшета вносят по 100 мкл конъюгата (меченные ферментом вторые общевидовые антитела) в рабочем разведении (1:1000) в буфере "С" и инкубируют 1,5 ч при 37°C, затем планшет отмывают, как описано выше, дополнительно ополоснув

10 планшет дистиллированной водой. В лунки планшета вносят по 70 мкл субстрат-индикаторного раствора, содержащего 0,04% орто-фенилендиамина в цитратно-фосфатном буфере (рН 5,0) и 10 мкл 33% H_2O_2 в расчете на 10 мл используемого буфера.

Цитратно-фосфатный буфер готовят при смешивании 49,3 мл 0,2 М двузамещенного фосфорнокислого натрия (1,42 г на 50 мл H_2O) и 50,7 мл 0,1 М лимоннокислого натрия (2,1 г на 100 мл H_2O). Планшет выдерживают 15-20 мин в темноте (для развития цветной 15 реакции) при комнатной температуре, затем добавляют в каждую лунку по 30 мкл 0,5 М H_2SO_4 для остановки реакции. Результаты реакции учитывают с помощью спектрофотометра, измеряя оптическую плотность раствора при длине волны равной 492 нм. При постановке ИФА на планшете одновременно измеряют оптическую плотность раствора в лунках, содержащих контроли:

20 - контроль положительный (контроли специфического связывания с каждым из антигенов в двух параллелях) - 100 мкл сыворотки крови больного ирсиниозом и 100 мкл сыворотки крови больного псевдотуберкулезом (сыворотки с бактериологически подтвержденным диагнозом) + 100 мкл конъюгата + 70 мкл субстрат-индикаторного раствора + 30 мкл H_2SO_4 ;

25 - контроль отрицательный (с каждым из антигенов) - 100 мкл сыворотки крови здорового донора + 100 мкл конъюгата + 70 мкл субстрат-индикаторного раствора + 30 мкл H_2SO_4 ;

- контроль неспецифического связывания - 100 мкл буферного раствора + 100 мкл конъюгата + 70 мкл субстрат-индикаторного раствора + 30 мкл H_2SO_4 .

30 Результат считают положительным, если величина, соответствующая отношению значения оптической плотности раствора в лунках со специфической сывороткой к значению оптической плотности раствора в лунках с нормальной сывороткой для каждого антигена больше или равна 2,1 [15].

Верификация иерсиниоза с учетом этиологии возбудителя при положительных значениях реакции осуществляется путем определения величин, равных отношению 35 значений оптической плотности раствора при взаимодействии одной и той же сыворотки крови больного с антигеном из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) и с антигеном из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) - $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ или, наоборот, $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$.

40 В случае, если эта величина больше или равна 2,0 ($ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.} \geq 2,0$), то подтверждается псевдотуберкулезная этиология заболевания, и, наоборот, если $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} \geq 2,0$, то этиологическим возбудителем иерсиниозной инфекции является *Y. enterocolitica*. В случае, если значения $ОП_{Y.ps.}$ и $ОП_{Y.e.}$ близкие или равные и значения отношений $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ и $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ соответственно близки или равны 1,0, то иерсиниозная инфекция обусловлена одновременно *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*.

45 Диагностический набор на иерсиниозы (псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз) для проведения заявляемого способа с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на основе видоспецифических антигенов - порина наружной мембраны (НМ) *Y. pseudotuberculosis* и порина НМ *Y. enterocolitica* предназначен для одномоментного выявления специфических антител к поринам НМ *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* 50 из одной пробы сыворотки крови человека и может использоваться в клинических и эпидемиологических исследованиях, а также службой крови.

Набор содержит все необходимые для проведения ИФА реагенты, кроме дистиллированной воды.

Состав набора:

1) планшет полистироловый 96-луночный (фирма «Dynatech» Швейцария или «Costar» США) с иммобилизованными антигенами (порины) из *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в герметично закрытом пакете - 1 шт.;

5 2) фосфатно-солевой буфер (концентрированный раствор буфера для инактивации и отмывки планшета для разведения сывороток и конъюгата) - 2 флакона.

3) конъюгат (фракция общевидовых антител против суммарной фракции иммуноглобулинов человека, меченных пероксидазой хрена) - 1 флакон;

4) субстрат (орто-фенилендиамин, 4 мг) - 1 флакон;

10 5) цитратно-фосфатный буфер - 1 флакон;

6) отрицательные и положительные контроли (лиофильно высушенные образцы сывороток крови больных с подтвержденным диагнозом «псевдотуберкулез» и «кишечный иерсиниоз», сыворотки крови здоровых доноров) - 4 флакона;

7) детергент (твин-20 или твин-80) - 1 флакон;

15 8) перекись водорода (H_2O_2 , концентрированный раствор) - 1 флакон;

9) стоп-реагент (раствор 0,5 М серной кислоты, H_2SO_4) - 1 флакон;

Набор рассчитан на 96 определений, включая контроли.

Приготовление реагентов для проведения анализа:

1. Буфер "А": содержимое 1-го флакона с концентратом фосфатно-солевого буфера (рН 20 7,4) (смесь солей: 0,02 М натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного, 0,02 М натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного и 0,1 М натрия хлористого) необходимо растворить в 1 л дистиллированной воды.

2. Буфер "В" для отмывки планшета и разведения исследуемых сывороток крови больных, положительного и отрицательного контролей: К 1 л буфера "А" добавить 0,5 мл 25 твин-20 (или твин-80) и получают буфер "В".

Предварительное разведение сывороток: исследуемые сыворотки крови больных, контрольные (положительные и отрицательные) сыворотки крови разводят буфером "В" до рабочего разведения.

3. Буфер "С" для инактивации планшета и разведения конъюгата: к 200 мл буфера "А" 30 добавляют 0,2 мл твин-20 (или твин-80) и получают буфер "С".

4. Субстратная смесь готовится непосредственно перед употреблением. Для проведения реакции содержимое флакона с субстратом (4 мг орто-фенилендиамина) растворяют в 10 мл цитратно-фосфатного буфера (готового к употреблению) и добавляют 10 мкл 33% H_2O_2 .

35 5. Стоп-реагент (раствор 0,5 М H_2SO_4) готов к использованию.

Для повышения достоверности результатов анализа исследуемые и контрольные образцы сыворотки крови рекомендуются ставить для каждого антигена в дубликатах, используя для каждого образца сыворотки две лунки.

40 Проведение иммуноферментного анализа с помощью предлагаемого диагностического набора:

Предварительно готовый планшет с иммобилизованными антигенами (порин из *Y. pseudotuberculosis* и порин из *Y. enterocolitica*, каждый из которых нанесен на половину планшета) требуется проинактивировать.

1). Инактивация планшета (предотвращение неспецифического связывания антигена с 45 антителами): вносят во все лунки по 300 мкл буфера "С" и инкубируют в течение ночи (16 ч - 18 ч) при 6-8°C. Буфер "С" состоит из фосфатно-солевого буфера с рН 7,4 (буфер "А") +0,1% твин-20 (или твин-80). Для приготовления буфера "А" необходимо растворить содержимое 1-го флакона (смесь солей: 0,02 М натрия фосфорнокислого двузамещенного 12-водного, 0,02 М натрия фосфорнокислого однозамещенного 2-водного и 0,1 М натрия 50 хлористого) в 1 л дистиллированной воды. Далее к 200 мл буфера "А" добавляют 0,2 мл твин-20 (или твин-80) и получают буфер "С" для инактивации планшета и для разведения конъюгата. Раствор не хранят.

2). Отмывка планшета: после инактивации удаляют содержимое лунок декантированием

и промывают их 3-5 раз по 5 мин от несвязавшихся компонентов буфером "В". Для приготовления буфера "В" к 1 л буфера "А" добавляют 0,5 мл твин-20 (или твин-80) и получают раствор для отмывания планшета и разведения сывороток. При каждой

5 декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

3). Нанесение по 100 мкл исследуемой сыворотки, положительного и отрицательного контролей для каждого антигена в двух параллелях: сыворотки наносят в диагностических титрах, определенных для каждого антигена (1:800 для порина из *Y. pseudotuberculosis*

10 и 1:1600 для порина из *Y. enterocolitica*), в буфере "В", как описано выше.

4). Инкубирование планшета при 37°C в течение 2 часов.

5). По окончании инкубации содержимое лунок удаляют и планшет промывают тщательно 3 раза буфером "В".

6). Вносят во все лунки по 100 мкл раствора конъюгата в рабочем разведении: рабочее разведение (1:1000) готовится при растворении содержимого флакона (сухого препарата)

15 в буфере "С".

7). Инкубирование планшета при 37°C в течение 1,5 часа.

8). По окончании инкубации из лунок удаляют содержимое и планшет промывают, как описано выше.

9). Нанесение субстратной смеси. Субстрат-индикаторный раствор готовится непосредственно перед употреблением: сухой препарат орто-фенилендиамина (4 мг, 1 флакон) растворяют в 10 мл 0,05 М цитратно-фосфатного буфера (рН 5.0) и добавляют 10 мкл 33% H_2O_2 . Для приготовления раствора цитратно-фосфатного буфера содержимое флакона (смесь солей) растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Перед нанесением

25 субстрат-индикаторного раствора планшет ополаскивают дистиллированной водой и высушивают.

10). Во все лунки планшета вносят по 70 мкл субстратной смеси и инкубируют в темноте в течение 15-20 мин при комнатной температуре.

11). Во все лунки в той последовательности, как и субстратную смесь, добавляют по 30 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции.

12). Регистрация результатов реакции: измеряют оптическую плотность раствора ферментативной реакции в лунках при длине волны равной 492 нм.

Результат считают положительным, если величина, соответствующая отношению значения оптической плотности раствора в лунках со специфической сывороткой к значению оптической плотности раствора в лунках с нормальной сывороткой для каждого антигена больше или равна 2,1 [15].

Верификация иерсиниоза с учетом этиологии возбудителя при положительных значениях реакции осуществляется путем определения величин, равных отношению значений оптической плотности раствора при взаимодействии одной и той же сыворотки

40 крови больного с антигеном из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) и с антигеном из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) - $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ или, наоборот, $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$.
В случае, если величина отношения $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ больше или равна 2,0 (при $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.} \geq 2,0$), то подтверждается псевдотуберкулезная этиология заболевания, и, наоборот, если $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} \geq 2,0$, то этиологическим возбудителем иерсиниозной инфекции является

45 *Y. enterocolitica*. В случае, если значения $ОП_{Y.ps.}$ и $ОП_{Y.e.}$ близкие или равные и значения отношений $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ и $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ соответственно близки или равны 1,0, то иерсиниозная инфекция обусловлена одновременно *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*.

ЛИТЕРАТУРА

50 1. Учайкин В.Ф., Гордеев А.В., Бениова С.Н. Иерсиниозы у детей. М.: ГЭОТАР - Медиа, 2005. 144 с.

2. Попова О.В., Шепелева Г.К., Шестокова И.В., Андреев И.В., Попова Т.И., Ющук Н.Д. Клинико-иммунологическая характеристика иерсиниозной инфекции. // Инфекц. болезни.

2006. Т.4. №3. С.51-55.

3. Ценева Г.Я. Иерсинии и иерсиниозы. СПб. Санкт-Петербург. 2006. 168 с.

4. Иерсиниоз. Методические рекомендации по эпидемиологии, клинике, диагностике, лечению и профилактике. МЗ СССР, четвертое Главное управление. 1985. 25 с.

5 5. Koroliuk A.M., Golovacheva S.N., Dulatova M.V. The choice of rational methods for determining antibodies to *Yersinia enterocolitica*. The agglutination reaction. // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1988. №9. P.45-47.

6. Бургасова О.А., Кулешова Л.Б., Ценева Г.Я. и др. Сравнительная оценка различных иммунологических реакций в диагностике псевдотуберкулеза. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиологии. 1996. №2. С.48-51.

7. Королюк А.М., Головачева С.Н., Дулатова М.В. Серологическая диагностика кишечного иерсиниоза. Конструирование стабильного эритроцитарного препарата для реакции непрямой гемагглютинации. // ЖМЭИ. 1990. №3. С.30-34.

8. Дулатова М.В., Антонов В.С., Головачева С.Н. и др. Опыт применения иммуноглобулинового эритроцитарного препарата для ранней лабораторной диагностики псевдотуберкулеза. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиологии. 1992. №4. С.55-57.

9. Сбойчаков В.Б., Королюк А.М., Вербов В.Н. и др. Применение твердофазного иммуноферментного анализа для серодиагностики псевдотуберкулеза. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиологии. 1986. №7. С.83-86.

10 10. Granfors K., Ogasawara M., Hill J.L., Lahesmaa-Rantala R., Toivanen A., Yu DTY. Analysis of IgA antibodies to lipopolysaccharide in *Yersinia*-triggered reactive arthritis. // J. Infect. Dis. 1989. V.159. P.1142-1147. Патент US 4831126 A от 16.05.1989.

11. Богаутдинов З.Ф., Вылегжанина Е.С., Кузьмина В.Б., Астахова Т.С., Ниязов Ю.Э., Шумилов К.В. Способ диагностики иерсиниозов. // Патент RU 2152037 C1 от 27.06.2000.

12 12. Малов И.В., Рубцов И.В., Ющенко Г.В., Леоненко В.В. Способ иммуноферментной диагностики иерсиниозов. // Патент SU 1767435 A1 от 10.07.1992.

13. Chart H., Cheasty T. The serodiagnosis of human infections with *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006. V.47. P.391-397.

14 14. Дельвиг А.А., Семенов Б.Ф. Механизмы формирования иммунного ответа к пориновым белкам наружной мембраны менингококков серогруппы В. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунологии. 1997. №6. С.92-96.

15. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 228 с.

16 16. Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Гузев К.В., Вакорина Т.И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.О. Структура и функция порообразующих белков бактерий рода *YERSINIA*. // Биоорганическая химия. 2006. Т.32. №4. С.371-383.

17. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М. 1962. С.30-66.

40

Формула изобретения

1. Способ дифференциальной диагностики псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, включающий определение специфических антител к возбудителям заболеваний в сыворотке крови больного методом твердофазного иммуноферментного анализа,

45 предусматривающего нанесение антигенов на планшет, отличающийся тем, что на одну половину планшета наносят видоспецифический белок порин наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis*, за диагностический титр принимают разведение сыворотки 1:800, а на другую половину планшета наносят видоспецифический белок порин наружной мембраны *Yersinia enterocolitica*, за диагностический титр принимают разведение сыворотки 1:1600 и верификацию псевдотуберкулеза от кишечного иерсиниоза осуществляют сравнением значений оптической плотности раствора в реакции сыворотки крови больного с антигенами из *Y. pseudotuberculosis* (ОП_{Y.ps.}) и из *Y. enterocolitica* (ОП_{Y.e.}), при величине отношения ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.} больше или равной 2,0 диагностируют

50

псевдотуберкулез, при величине отношения $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ больше или равной 2,0 диагностируют кишечный иерсиниоз, при величинах отношений $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ и $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ равных 1,0 диагностируют смешанную форму иерсиниозной инфекции.

2. Диагностический набор на псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз характеризуется тем, что он содержит планшет с иммобилизованными антигенами - видоспецифическими белками-поринами наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, образцы контрольных (положительной и отрицательной) сывороток крови и вторых общевидовых антител, емкости с готовыми для употребления инактивирующим и стоп-реагентами, субстратом и буферными системами.

10

15

20

25

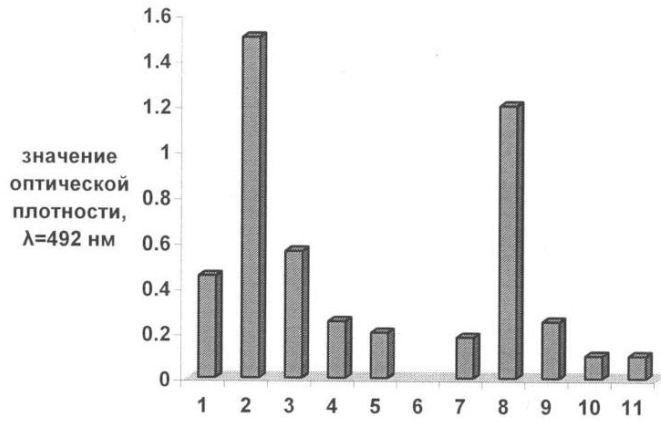
30

35

40

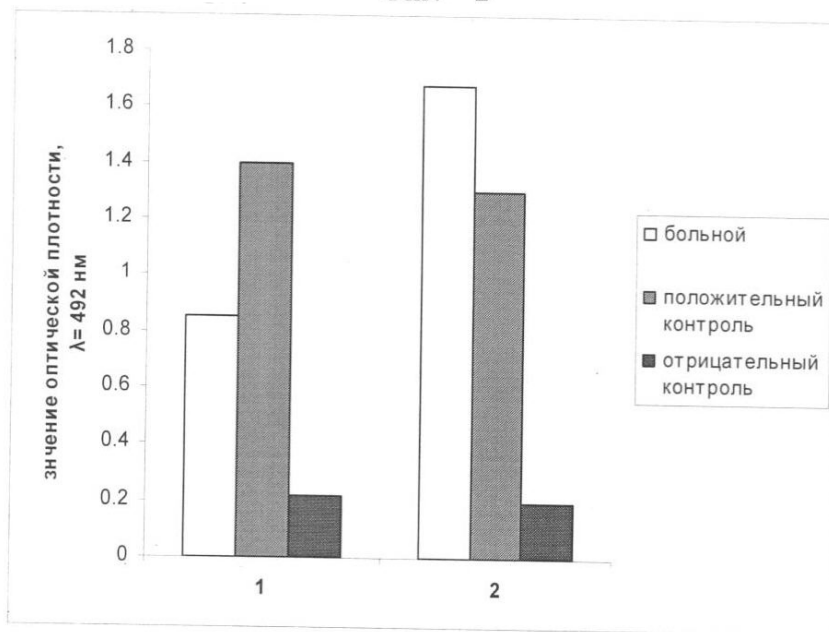
45

50



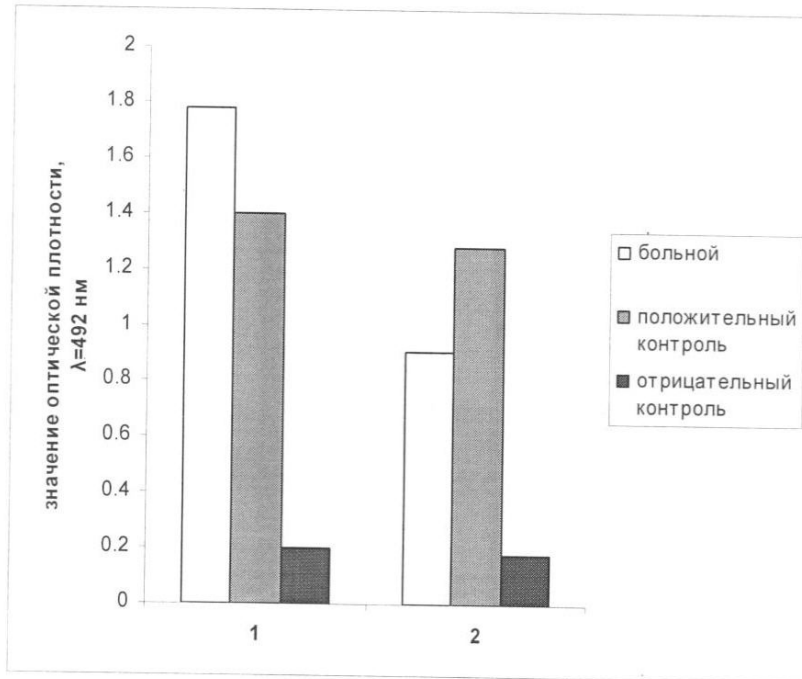
Анализ сывороток крови больных (сальмонеллезом, иерсиниозом, псевдотуберкулезом, гепатитами) и доноров в разведении 1:800 (ряды 1,2,3,4,5) и 1:1600 (ряды 7,8,9,10,11) с помощью ИФА тест-системы на основе порина из *Y. enterocolitica*.

Фиг. 2



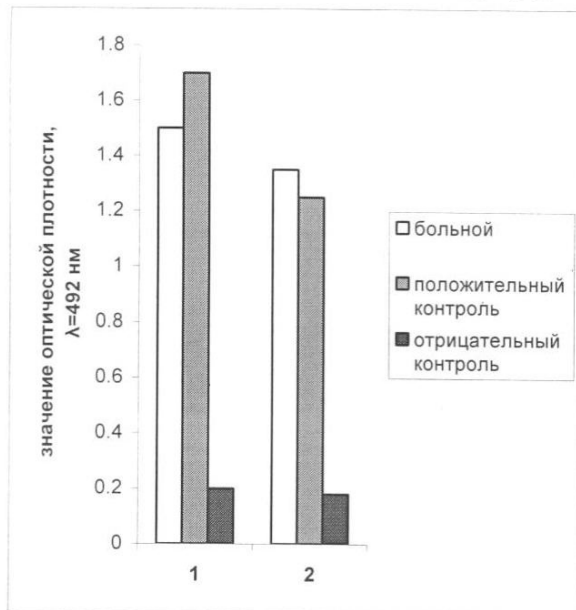
Верификация кишечного иерсиниоза: среднее значение оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) в 2 раза больше среднего значения оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) — $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} > 2,0$.

Фиг. 3а



Верификация псевдотуберкулеза: среднее значение оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) в 2 раза больше среднего значения оптической плотности раствора в реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) — $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.} > 2,0$.

Фиг. 3б.



Верификация смешанной формы иерсиниозной инфекции: значение оптической плотности реакции с порином из *Y. enterocolitica* ($ОП_{Y.e.}$) равно (или близко) значению оптической плотности реакции с порином из *Y. pseudotuberculosis* ($ОП_{Y.ps.}$) — $ОП_{Y.e.} = ОП_{Y.ps.}$, $ОП_{Y.e.}/ОП_{Y.ps.}$ и $ОП_{Y.ps.}/ОП_{Y.e.}$ близки или равны 1,0.

Фиг. 3в