

**СИМАКОВА ДИАНА ИГОРЕВНА**

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕННОГО  
ПОЛИМЕРНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА**

03.02.03 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону, 2019

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

**Научный руководитель:** **Павлович Наталья Владимировна**, доктор медицинских наук

**Официальные оппоненты:** **Жарникова Ирина Викторовна**, доктор биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций

**Осина Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая отделом микробиологии

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится **«3» октября 2019 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Микшик Наталья Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Псевдотуберкулез относится к широко распространенным в мире сапронозным инфекциям, являясь причиной как единичных спорадических случаев, так и массовых вспышек. Наиболее тяжелое течение инфекции, в отличие от Западноевропейских стран и Америки, отмечено в России, Японии и Корее. В Российской Федерации ежегодно регистрируют около 3 тысяч случаев, однако истинный уровень заболеваемости до конца не определен (Иерсиниозы в Российской Федерации, 2017; Tseneva G.Y. et al., 2012; Amphlett A., 2015).

В настоящее время описан 21 серовар псевдотуберкулезного микробы, отличающиеся по ряду биологических свойств (Кокорина Г.И., 2013; Tsubokura M., Aleksic S., 1995). Эпидемическое значение в патологии человека имеют девять сероваров (O:1a, O:1b, O:1b, O:1c, O:1II, O:1Va, O:1Vb, O:Va, O:Vb), которые наиболее часто выделяются от больных (Сомов Г.П. с соавт., 2001; Palonen E., 2015). На территории России тяжелые формы инфекции обусловлены циркуляцией штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* I серовара.

Псевдотуберкулез характеризуется многообразием клинических проявлений, имеет симптоматику, близкую к другим 36 нозологическим единицам (Ющук Н.Д. соавт., 2003), что существенно затрудняет своевременное распознавание заболевания и приводит к развитию осложнений и формированию хронических форм инфекции (до 30 %) (Ценева Г.Я. с соавт., 2002).

Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза включает в себя комплекс исследований с применением бактериологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов (МУ 3.1.1.2438-09). Выделение культуры *Y. pseudotuberculosis* является «золотым стандартом» и наиболее информативно при острой стадии заболевания. Однако при хронических или атипичных формах инфекции эффективность и информативность данного метода снижается (Кокорина Г.И. с соавт., 2006; Fendler C. et al., 2001).

Таким образом, трудности в клинической диагностике болезни повышают актуальность совершенствования методов лабораторной диагностики.

**Степень разработанности темы исследования.** Наиболее широкое применение при диагностике псевдотуберкулеза у человека получили иммунологические методы, позволяющие выявлять специфические антитела в сыворотках крови больных. Однако набор диагностических препаратов, официально зарегистрированных и регламентированных,

крайне ограничен (Назаров В.Е. с соавт., 2015; Каримова Т.В., 2017). Более того, при явных достоинствах, каждый из этих методов не лишен некоторых недостатков: дороговизна тест-систем для иммуноблоттинга, высокий процент неспецифических реакций в ИФА (до 50 % при респираторном хламидиозе и боррелиозе Лайма и др.) (Rawlins M.L. et al., 2005).

Для проведения РНГА в России выпускается «Берлез® диагностикум эритроцитарный псевдотуберкулезный антигенный сухой» (ФГУП СПбНИИВС) на основе антигенов липополисахаридной природы и эритроцитов барана. Вместе с тем, воспроизводимость результатов РНГА ограничивается кратковременной пригодностью нативных эритроцитов и зависит от вида животного, пола доноров, времени года и т.д. Кроме того, требуются дополнительные этапы обработки исследуемых образцов (инактивация исследуемых сывороток и их адсорбция контрольными эритроцитами) для исключения возможных неспецифических реакций. Одним из обязательных условий при работе с эритроцитарным диагностикумом является периодическая (не реже 1 раза в квартал) проверка его активности (Березняк Е.А., 2010; Павлова Л.А. с соавт., 2010; Кедик С.А. с соавт., 2013).

Одним из перспективных направлений при разработке диагностических тест-систем является использование инертных синтетических полимерных микросфер со специфическими биолигандами, которые могут быть охарактеризованы по заряду, химическому строению, диаметру (Мартынов А.И. с соавт., 2001; Станишевский Я.М. с соавт., 2006; Basinska T. et al., 2005).

На момент начала настоящего исследования тест-система для выявления антител к возбудителю псевдотуберкулеза с помощью реакции агглютинации объемной (РАО) на основе полимерного диагностикума не была разработана. В связи с вышеизложенным представляется актуальным создание простого, экономичного и доступного антигенного диагностикума на основе видоспецифических иммунодоминантных антигенов *Y. pseudotuberculosis* и полимерного носителя.

**Цель исследования** - выявление специфических иммунодоминантных антигенов *Y. pseudotuberculosis*, общих для эпидемически значимых сероваров, и конструирование на их основе видоспецифического полимерного иммунобиологического препарата для диагностики псевдотуберкулеза.

#### **Задачи исследования:**

1. Провести анализ биологических свойств штаммов возбудителя псевдотуберкулеза из коллекции музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, отобрать для дальнейшего исследования типичные штаммы эпидемически значимых сероваров (O:Ia, O:Ib, O:IIb, O:IIc, O:III, O:IVa, O:IVb, O:Va, O:Vb).

2. Изучить спектр поверхностных антигенов исследуемых штаммов *Y. pseudotuberculosis*, оценить их специфичность, подтвердить локализацию в составе наружных мембран, показать возможность использования для конструирования полимерного антигennого диагностикума.

3. Создать коллекцию иммунных сывороток, включающую экспериментальные кроличьи сыворотки к различным сероварам *Y. pseudotuberculosis* и полученному препарату белков наружных мембран серовара O:Ia, а также коммерческие и экспериментальные сыворотки к близкородственным и гетерологичным бактериальным видам. Сформировать коллекцию сывороток от людей, больных псевдотуберкулезом и другими инфекционными болезнями.

4. Определить оптимальные условия для эффективной сенсибилизации полимерного носителя антигенным препаратом и сконструировать псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный диагностикум.

5. Оценить аналитические и диагностические характеристики разработанного полимерного диагностического препарата с использованием панели экспериментальных и коммерческих иммунных сывороток, а также сывороток от людей, больных псевдотуберкулезом и другими инфекционными болезнями.

**Научная новизна.** Проведена систематизация коллекции музеиных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территориях Российской Федерации, Западной Европы и Восточной Азии по фенотипическим, биохимическим и молекулярно-биологическим свойствам.

С помощью современных методов получены уникальные белковые профили (MALDI-ToF-MS) отобранных для дальнейшего исследования эпидемически значимых штаммов *Y. pseudotuberculosis*, охарактеризован жирнокислотный состав (газовая хромато-масс-спектрометрия) типового патогенного для человека штамма серовара O:Ia.

Показано, что полученный из наружных мембран бактерий с помощью солюбилизации N-лаурилсарказинатом натрия антигенный препарат содержит комплекс специфических антигенов белковой природы, четыре из которых являются

иммунодоминантными, и может быть использован в качестве сенситина при разработке иммунобиологических препаратов.

Разработан новый способ получения псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума на основе латексных микросфер и белков наружной мембранны *Y. pseudotuberculosis* для РАО, приоритет которого подтвержден патентом на изобретение № 2430376 от 27.09.2011 г.

Показана возможность выявления специфических антител к возбудителю псевдотуберкулеза с использованием полученного диагностикума в биологическом материале (сыворотка крови больных).

**Теоретическая и практическая значимость работы, внедрение результатов исследования.** На основе анализа биологических свойств 607 штаммов *Y. pseudotuberculosis* создана и зарегистрирована пополняемая база данных «Псевдотуберкулез» (Свидетельство № 2011620370 от 17.05.2011 г.), которая может явиться основой для создания ГИС «Псевдотуберкулез». Исследованные фенотипические, биохимические и молекулярно-биологические свойства штаммов *Y. pseudotuberculosis* внесены в паспортные данные штаммов. База данных внедрена в работу лаборатории микробиологии чумы и других иерсиниозов (акт внедрения от 13.03.2014 г.), используется в лаборатории диагностики ОИ и музее живых культур с центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акты от 22.04.2014 г.).

Впервые получена репрезентативная панель экспериментальных иммунных сывороток к возбудителю псевдотуберкулеза различных сероваров, препарату белков наружных мембран (БНМ) серовара O:1a, а также к возбудителям других инфекций. Сформирована коллекция сывороток от людей, больных псевдотуберкулезом и другими инфекциями.

Определены наиболее эффективные условия сенсибилизации полимерного носителя (концентрация сенситина, буферная система, окрашенные полиакролеиновые микросфера) антигенами БНМ *Y. pseudotuberculosis*.

Сконструирована тест-система для выявления специфических антител к возбудителю псевдотуберкулеза в реакции агглютинации объемной. Составлены и утверждены директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора технические условия «Диагностикум псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный сухой для РАО», «Нормальная кроличья сыворотка лиофилизированная для реакции

агломерации объемной» и «Инструкция по применению диагностикума псевдотуберкулезного антигенного полимерного сухого для РАО» (протокол № 8 от 07.09.2017 г.).

На базе ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора (г. Ростов-на-Дону) проведены испытания экспериментальных серий видоспецифического антигенного полимерного псевдотуберкулезного диагностикума для выявления антител к *Y. pseudotuberculosis* в сыворотках животных - переносчиков инфекции (акт испытания от 14.06.2017 г.). Получено положительное заключение о возможности использования предлагаемого диагностикума для детекции антител к возбудителю псевдотуберкулеза.

При исследовании клинического материала подтверждена возможность применения экспериментальных серий разработанного диагностикума в лабораторной диагностике псевдотуберкулеза у людей.

Материалы диссертационной работы используются при проведении теоретических и практических занятий по микробиологии и лабораторной диагностике псевдотуберкулеза на курсах дополнительного послевузовского образования отдела профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 14.09.2017 г.).

**Методология и методы исследования.** В работе были использованы различные методы исследования: микробиологические (культтивирование штаммов микроорганизмов, ферментативная активность бактерий), биохимические (выделение клеточных оболочек, экстракция белков, электрофорез), иммунохимические (иммуноблоттинг, дотблоттинг), иммунологические (получение иммунных сывороток, РА, РАО, ИФА, РНГА, РТПГА), молекулярно-биологические (MALDI-ToF-MS, газовая хромато-масс-спектрометрия), биоинформационный анализ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. На основании анализа биологических свойств коллекционных штаммов *Y. pseudotuberculosis* создана база данных «Псевдотуберкулез», получены уникальные белковые и жирнокислотные профили девяти эпидемически значимых штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

2. Препарат, выделенный из наружных мембран *Y. pseudotuberculosis* серовара O:1a, содержит общие для эпидемически значимых сероваров специфические иммунодоминантные антигены (м.м. 16-17, 25-27, 35-37, 41-43 кДа) и может быть

использован в качестве сенситина при конструировании видоспецифического диагностикума.

3. Оптимальными условиями получения псевдотуберкулезного антигенного диагностикума на основе полимерных микросфер и сенситина является использование 0,1 М бикарбонатного буферного раствора (рН 9,2±0,1) при сенсибилизирующей дозе 1 мг сенситина/100 мг сфер. Сконструированная тест-система позволяет выявлять в РАО антитела к возбудителю псевдотуберкулеза с чувствительностью 86 %, специфичностью 89 %, точностью 87 %. Диагностический титр для разработанной тест-системы составляет 1:160.

**Степень достоверности и аprobация результатов.** Экспериментальная часть исследования выполнена на прошедшем метрологическую поверку оборудовании. Степень достоверности результатов серологических исследований подтверждена результатами трех независимых экспериментов. Для иммунологических исследований (РНГА, РА, ИФА) использованы коммерческие сертифицированные диагностические сыворотки и тест-системы с действующим сроком годности. Статистическая обработка результатов исследования диагностических характеристик полученного диагностикума осуществлялась согласно методам доказательной медицины с использованием четырехпольных таблиц (Флетчер Р. с соавт., 1998; Власов В.В., 2006).

Материалы диссертации были представлены на IV международной конференции «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями» (Санкт-Петербург, 2008); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, 2009); научно-практической конференции «Современные аспекты эпиднадзора и профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней» (Иркутск, 2009); научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (Ростов-на-Дону, 2009); научно-практической школе-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2010); III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями» (Санкт-Петербург, 2011); X межвузовской конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов-на-Дону, 2011); научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 2013); научно-практической конференции «Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных болезней» (Ростов-на-Дону, 2014); международной

конференции «Общие угрозы - совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней» (Москва, 2015); VII и VIII Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 2015; Москва, 2016); XIII межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (Саратов, 2016); XI Съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (Москва, 2017); IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017); XI научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России» (Краснодар, 2018); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018); X Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018); United States - Japan Cooperative Medical Sciences Program 53rd Year Joint Panel Conference «Cholera & Other Bacterial Enteric Infections» (Hanoi, Vietnam, 2019); научных конференциях молодых ученых ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в 2010 - 2018 гг.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 22 работы, в том числе 3 - в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации», 1 патент на изобретение, в Госреестре РФ зарегистрирована 1 база данных «Псевдотуберкулез».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 155 страницах и состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Библиографический указатель включает 274 источника литературы, в том числе 158 отечественных и 116 зарубежных. Работа проиллюстрирована 18 таблицами и 16 рисунками.

**Место выполнения и личный вклад автора.** Работа выполнялась в рамках плановых научных тем: «Совершенствование псевдотуберкулезных антигенных диагностических препаратов» (2005-2010 гг.) № ГР 0120.0507854, «Совершенствование

серологической диагностики холеры» (2011-2015 гг.) № ГР 0120.1002615, «Внедрение новых технологий и алгоритмов в лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней» (2017-2019 гг.) № ГР АААА-А16-116112810064-1.

Автором лично проведен анализ литературных источников по теме исследования, определена цель работы, осуществлен выбор путей решения поставленных задач. В ходе работы автор анализировала и систематизировала данные о коллекции штаммов возбудителя псевдотуберкулеза ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, осуществляла подбор штаммов для дальнейшей работы на основе полученных характеристик. Основная часть экспериментальной работы (бактериологические, биохимические, иммунохимические и серологические исследования) автором выполнена самостоятельно. MALDI-ToF-MS проводили совместно с к.б.н. Чемисовой О.С., анализ данных белкового профилирования - с к.м.н. Водопьяновым А.С., к.б.н. Сорокиным В.М., газовую хромато-масс-спектрометрию - под руководством к.б.н. Писанова Р.В., д.б.н., профессора Осипова Г.А. (отдел исследований и разработок Международного аналитического центра ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** С целью выбора для работы типичных эпидемически значимых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза изучены паспортные данные 607 штаммов *Y. pseudotuberculosis* из коллекции музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов (МЖК с ЦПВ) ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, выделенных на территориях Российской Федерации, Западной Европы и Восточной Азии. В соответствии с МУ 3.1.1.2438-09, штаммы были изучены по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим и молекулярно-биологическим свойствам. Для дальнейшей работы отобраны эпидемически значимые 9 штаммов 5-ти сероваров *Y. pseudotuberculosis*, выделенные при эпидемических вспышках в 1984-1986 годах. Для получения более подробных характеристик штаммов использовали MALDI-ToF-MS на масс-спектрометре «Autoflex speed III Bruker Daltonics» (Германия) с программным обеспечением «Flex Control», идентификацию проводили с помощью программы «Biotype». Обеззараживание и экстракцию белков осуществляли в соответствии с МР 4.2.0089-14. Конвертацию полученных raw-файлов выполняли программой «ProteoWizard» (Chambers M.C. et al., 2012). Идентификацию пиков проводили в среде R с помощью пакета «MALDIQuant» (Gibb S. et al., 2012). Для кластерного анализа и

построения дендрограммы использовали авторское программное обеспечение по методу UPGMA и программу «MEGA 5» (Tamura K. et al., 2011).

Анализ белкового состава и антигенного спектра 9-ти сероваров *Y. pseudotuberculosis* исследовали электрофоретическим разделением лизатов по методике Laemmli (1970) в поликариламидном геле (ПААГ) (Barenkamp S.J., 1981) с окрашиванием Coomassie R-250 (Chart H. et al., 2006). Иммуноблоттинг выполняли по методу Towbin (1979) с обработкой экспериментальными псевдотуберкулезными сыворотками с выявлением иммуно-активных зон с помощью диаминобензидина.

Получение антигенных фракций штамма *Y. pseudotuberculosis* серовара O:1a осуществляли экстракцией антигена из бактериальных клеток мочевиной, а также из изолированных наружных мембран с помощью N-лаурилсаркозината натрия или мочевины. Специфичность препаратов оценивали методом иммуноблоттинга с экспериментальными сыворотками к *Y. pseudotuberculosis* и близкородственным иерсиниям. Белковую природу выявляемых антигенов подтверждали с помощью обработки препарата проназой К (Аронова Н.В., 2005). Метод газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) использовали для сравнительного изучения профиля жирных кислот (ЖК) в бактериальном лизате серовара O:1a, препаратах БНМ и ЛПС. С целью получения экспериментальных иммунных сывороток к *Y. pseudotuberculosis* и препарату БНМ кроликам вводили 5-ти кратно (с интервалом 5 дней) обеззараженную взвесь бактерий каждого из 9-ти сероваров или 4-х кратно препарат БНМ (интервал 10 дней). Специфическую активность полученных сывороток определяли в РА и РНГА (МУ 3.1.1.2438-09). Нормальную кроличью сыворотку (НКС), используемую в качестве разводящей жидкости, получали от 5 здоровых кроликов с последующим объединением индивидуальных сывороток.

При конструировании псевдотуберкулезного диагностикума в качестве сенситина использовали полученный антигенный препарат, в качестве носителя - сферические окрашенные латексные сферы размером 1,5 мкм. Эффективность сенсибилизации изучали при различных условиях: буферная система, сенсибилизирующая доза, полнота степени связывания сенситина с носителем. Аналитические и диагностические характеристики разработанного диагностикума оценивали с помощью методов РАО и РНГА (референтный метод) с использованием панели экспериментальных и коммерческих сывороток к возбудителю псевдотуберкулеза и другим инфекциям. Оценку эффективности диагностикума и статистическую обработку результатов осуществляли на основе

четырехпольных таблиц со следующими показателями: чувствительность (Se), специфичность (Sp), точность (De) (Флетчер Р. с соавт., 1998; Власов В.В., 2006; Гринхальх Т., 2008; Березняк Е.А., 2010). Диагностические показатели определяли при использовании коллекции сывороток от людей с подтвержденными диагнозами псевдотуберкулез, респираторный хламидиоз, боррелиоз Лайма и аутоиммунный тиреоидит.

**Характеристика коллекции штаммов *Y. pseudotuberculosis* и выбор штаммов для исследования.** В результате систематизации паспортных данных 607 коллекционных штаммов и изучения их биологических свойств (культуральные, морфологические, серологические и биохимические) сформирована и зарегистрирована в Госреестре РФ пополняемая база данных «Псевдотуберкулез» (свидетельство № 2011620370 от 17 мая 2011 г.). Для дальнейшего исследования были отобраны типичные эпидемически значимые штаммы 5-ти сероваров *Y. pseudotuberculosis* (O:Ia, O:Ib, O:IIb, O:IIc, O:III, O:IVa, O:IVb, O:Va, O:Vb). Выбранные штаммы были изучены с помощью традиционных и молекулярно-биологических (масс-спектрометрия) методов исследования, что позволило внести расширенные характеристики в их паспортные данные (акт от 22.04.2014).

Анализ белковых профилей штаммов методом MALDI-ToF-MS позволил выявить около 50 общих для всех девяти сероваров белков при наличии индивидуальных пиков низкой интенсивности. Оценка дендрограммы (рис. 1) показала разделение штаммов на два основных кластера, один из которых сформирован большинством штаммов, включая серовар O:Ia. В этот же кластер вошли японские штаммы (O:IIc, O:IVb, O:Va, O:Vb), наиболее близкие по своим свойствам к высоко патогенным дальневосточным, вызывающим тяжелую клинику скарлатиноподобной лихорадки.

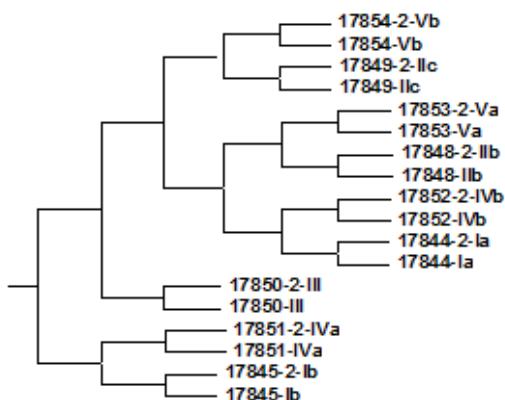


Рисунок 1 - Дендрограмма белковых спектров лизатов *Y. pseudotuberculosis*

**Изучение антигенной структуры девяти сероваров *Y. pseudotuberculosis*.** При электрофоретическом разделении лизатов штаммов и иммуноблоттинге установлено, что

при большом количестве выявляемых полос общими иммунодоминантными антигенами для всех девяти сероваров являются четыре белковых антигена с м.м. 41-43, 35-37, 25-27 и 16-17 кДа. Экспериментальные индивидуальные кроличьи сыворотки к каждому из девяти сероваров содержали антитела, четко взаимодействующие с этими антигенами лизата серовара O:Ia. Остальные иммуноактивные зоны в различных вариациях присутствовали у большинства, но не у всех сероваров. В то же время, при обработке иммуноблотов сыворотками к *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*, было зарегистрировано наличие от 5 до 9 антиген-активных зон. В этой связи дальнейшим направлением исследований явилось получение сенситина на основе специфических антигенов из БНМ *Y. pseudotuberculosis*.

Выделение антигенных фракций проводили с помощью экстракции белков из изолированных наружных мембран N-лаурилсаркозинатом натрия (первый вариант), из наружных мембран при использовании мочевины, а также из бактериальных клеток (второй и третий варианты). При электрофоретическом изучении этих трех вариантов установлено, что экстракция N-лаурилсаркозинатом натрия позволяет получить препарат, содержащий наибольшее количество белковых полос. Доказательством их белковой природы служит их отсутствие в ПААГ после обработки препарата проназой К. Результаты иммуноблоттинга препарата с индивидуальными сыворотками к 9 сероварам *Y. pseudotuberculosis* выявили наличие, по меньшей мере, 10 антиген-активных зон (рис. 2). Низкомолекулярный «пуф», присутствующий во всех треках, предположительно может относиться к кору или липиду А ЛПС псевдотуберкулезного микробы. Для подтверждения этого был проведен сравнительный анализ спектра ЖК бактериального лизата культуры серовара O:Ia, полученного из него антигенного препарата и очищенного ЛПС с применением газовой хромато-масс-спектрометрии.

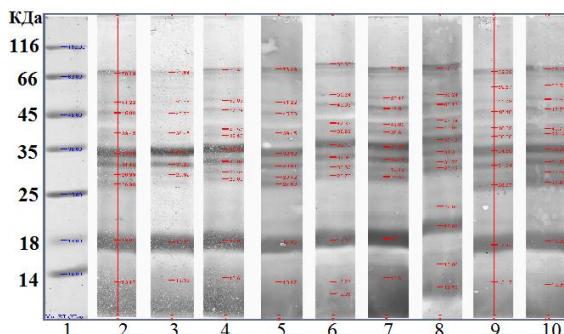


Рисунок 2 - Результаты иммуноблоттинга антигенного препарата с сыворотками к различным сероварам *Y. pseudotuberculosis*: 1 - маркеры мол. масс; 2 - O:Ia; 3 - O:IIb; 4 - O:IIa; 5 - O:IIc; 6 - O:III; 7 - O:IVa; 8 - O:IVb; 9 - O:Va; 10 - O:Vb.

Все препараты имели различный качественно-количественный жирнокислотный профиль, однако все содержали 3-гидрокситетрадекановую кислоту, характерную для ЛПС псевдотуберкулезного микробы (Бахолдина С.И. с соавт., 2007; Андрюков А.А. с соавт., 2015; Tan Y. et al., 2010): в лизате серовара O:1a - 7,73 %, в препарате ЛПС - 43,79 %, в препарате БНМ - 0,49 % от общего объема. Таким образом, полученный препарат представлен антигенами преимущественно протеиновой природы с незначительным содержанием ЛПС.

При изучении видоспецифичности исследуемого препарата в иммуноблоте с экспериментальными сыворотками к *Y. pestis* и *Y. enterocolitica* выявлена незначительная примесь перекрестно-реагирующих антигенов (в области м.м. 16-17 кДа). Отсутствие иммунологически активных белков в высокомолекулярной зоне свидетельствует в пользу того, что именно в этой области локализованы иммуногены, характеризующиеся высокой специфичностью в отношении *Y. pseudotuberculosis*. Полученные результаты предполагают возможность использования данного препарата в качестве сенситина для дальнейшего конструирования антигенного диагностикума.

**Конструирование псевдотуберкулезного видоспецифического антигенного полимерного диагностикума на основе белков наружных мембран.** В качестве носителя использовали окрашенные сферические латексные полимерные частицы диаметром 1,5 мкм, содержащие альдегидные группы. При изучении различных условий сенсибилизации установлено, что оптимальными параметрами являются применение бикарбонатного буферного раствора (pH 9,2±0,1) и сенсибилизирующей дозы 1 мг/100 мг сфер. Показано, что эти условия обеспечивают наиболее полное связывание антигенов с носителем. Несколько серий экспериментальных диагностикумов при постановке РАО микрометодом продемонстрировали картину завершенной серологической реакции с четким переходом результата от положительного к отрицательному и характеризовались стабильностью при хранении.

Таким образом, отработана технология конструирования псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума, приоритет способа получения которого подтвержден патентом на изобретение № 2430376 от 27.09.2011 г.

**Оценка аналитических и диагностических характеристик видоспецифического антигенного полимерного псевдотуберкулезного диагностикума.** Изучение аналитических характеристик разработанного диагностикума в РАО проводили на панели сывороток: экспериментальные кроличьи сыворотки к каждому из девяти сероваров

*Y. pseudotuberculosis*; экспериментальные сыворотки к *Y. pestis* (4 сыворотки) и *Y. enterocolitica* (40 сывороток); коммерческие псевдотуберкулезные, сальмонеллезные, шигеллезные и эшерихиозные сыворотки. В качестве позитивных контролей использовали экспериментальную сыворотку к сенситину (антигенный препарат БНМ) и псевдотуберкулезную сыворотку из коммерческого диагностического набора для РНГА с максимальными титрами (1:2560-1:5120). Разработанный диагностикум взаимодействовал с гомологичными сыворотками в титрах 1:640-1:2560, специфичность антител подтверждена в реакции торможения агглютинации. Диагностикум не взаимодействовал с большинством экспериментальных сывороток против возбудителей чумы, кишечного иерсиниоза, с коммерческими гетерологичными сыворотками. В единичных сыворотках к отдельным сероварам *Y. enterocolitica* выявлялись перекрестные реакции в низких титрах (1:20-1:40).

Для оценки качества разрабатываемых диагностических препаратов рекомендованы следующие операционные характеристики: чувствительность, специфичность и точность. Соотношение между результатами тестирования и наличием признака, определяемого с помощью референтного метода («Берлез® диагностикум эритроцитарный псевдотуберкулезный антигенный для РНГА»), оценивали с помощью четырехпольных таблиц.

Проведен сравнительный анализ 60 сывороток: 42 сыворотки от больных с клиническими проявлениями псевдотуберкулеза, 8 - от больных с гастроэнтерологическими заболеваниями, 10 - от здоровых доноров. Часть сывороток была любезно предоставлена профессором, д.м.н. Г.Я. Ценевой (лаборатория бактериальных капельных инфекций ФБУН НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург).

Сыворотки на наличие антител к возбудителю псевдотуберкулеза тестировали двумя методами (РНГА и РАО). В обеих реакциях были получены сопоставимые результаты: антитела к возбудителю псевдотуберкулеза выявлены в  $70\pm1,7\%$  от общего числа исследованных сывороток, антитела отсутствовали в  $30\pm1,1\%$ .

В качестве точек разделения - величины, которая служит границей, разделяющей больных и здоровых людей (Власов В.В., 1997) - были выбраны значения титров в РАО - 1:80, 1:160, 1:320. Оптимальным является диагностический тест, сочетающий в себе как высокую специфичность, так и высокую чувствительность. Операционные характеристики, полученные для указанных трех точек разделения, приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Диагностические операционные характеристики полимерного псевдотуберкулезного РАО-диагностикума

№ п/п (номер точки разделения)	Точка разделения	Диагностическая чувствительность, %	Диагностическая специфичность, %	Точность, %
1	1:80	88,1	77,7	85
2	<b>1:160</b>	<b>85,7</b>	<b>88,9</b>	<b>86,7</b>
3	1:320	28,6	94,4	48,3

График соотношения чувствительности, специфичности и точности разработанного РАО - диагностикума в зависимости от точки разделения представлен на рисунке 3.

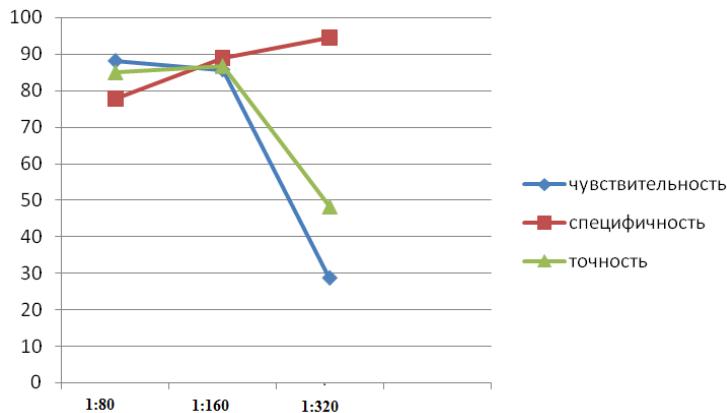


Рисунок 3 - Диагностические характеристики РАО-диагностикума для точек разделения 1:80, 1:160 и 1:320

Оптимальное соотношение между чувствительностью, специфичностью и точностью РАО-диагностикума соответствует точке разделения 1:160, что служит основанием считать этот показатель диагностически значимым.

**Изучение специфичности экспериментального диагностикума при исследовании сывороток людей с различными инфекционными и соматическими заболеваниями.** В литературе имеются сведения о перекрестных реакциях *Y. pseudotuberculosis* с антителами к иерсиниям, представителям других бактериальных видов и тиреоглобулину (Учайкин В.Ф. с соавт., 2008; Benvenga S. et al., 2004; Chart H. et al., 2006; Golkocheva-Markova E. et al., 2008), что обусловило целесообразность проведения специального исследования РАО-диагностикума с сыворотками крови пациентов, серопозитивных в отношении респираторного хламидиоза, боррелиоза Лайма, аутоиммунного тиреоидита (таблица 2). Как видно из данных таблицы, у больных с псевдотуберкулезом в 86 % случаев выявляются специфические антитела в диагностическом титре 1:160 и выше.

При изучении 57 сывороток больных респираторным хламидиозом, 7 сывороток больных боррелиозом Лайма и 38 сывороток людей с аутоиммунным тиреоидитом были обнаружены перекрестные реакции в титрах 1:40 - 1:80 (8,8 %, 43 % и 34 % случаев соответственно). Результаты РАО показали, что ни одна исследуемая гетерологичная сыворотка не содержала антител к возбудителю псевдотуберкулеза в титрах, равных или превышающих рассчитанный нами диагностический титр.

Таблица 2 - Результаты исследования в РАО сывороток людей с клинически и лабораторно подтвержденными диагнозами псевдотуберкулеза, респираторного хламидиоза, боррелиоза Лайма и аутоиммунного тиреоидита

Сыворотки пациентов	Всего проб	Титр в РАО							
		отриц	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Псевдотуберкулез	42	1 2,3%	0 -	4 9,5%	1 2,4%	24 57%	7 17%	2 4,7%	3 7,1%
Хламидиоз респираторный	57	52 91,2 %	0 -	4 7,0%	1 1,8%	-	-	-	-
Боррелиоз Лайма	7	4 57%	0 -	2 28,6%	1 14,4 %	-	-	-	-
Аутоиммунный тиреоидит	38	25 65,9 %	0 -	8 21%	5 13,1 %	-	-	-	-

Таким образом, экспериментальные данные и результаты исследования клинического материала от больных людей свидетельствуют о достаточно высокой активности и специфичности сконструированного видоспецифического псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума.

По итогам проведенной работы сформирован диагностический набор «Диагностикум псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный сухой для РАО», в который входят лиофилизированный псевдотуберкулезный диагностикум, лиофилизированная контрольная позитивная псевдотуберкулезная кроличья сыворотка, нормальная кроличья сыворотка в качестве разводящей жидкости, раствор хлористого натрия и планшет для иммунологических реакций. Составлены и утверждены директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора технические условия «Диагностикум псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный сухой для РАО», «Нормальная кроличья сыворотка лиофилизированная для реакции

агломерации объемной», «Инструкция по применению диагностикума псевдотуберкулезного антигенного полимерного сухого для РАО» (протокол № 8 от 07.09.2017).

## Выводы

1. На основании изучения фенотипических, культуральных и биохимических свойств коллекционных штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выделенных на территориях Российской Федерации, Западной Европы и Восточной Азии, создана пополняемая база данных «Псевдотуберкулез».

2. Белковое профилирование эпидемически значимых штаммов возбудителя псевдотуберкулеза методом MALDI-ToF-MS показало, что патогенные для человека штаммы *Y. pseudotuberculosis* имеют не менее 50 общих пиков высокой интенсивности при незначительном количестве серовароспецифических пиков низкой интенсивности.

3. Полученный антигенный препарат содержит четыре иммунодоминантных антигена белковой природы (16-17, 25-27, 35-37 и 41-43 кДа). Анализ жирнокислотного профиля лизата *Y. pseudotuberculosis* серовара O:1a, выделенного из него очищенного препарата ЛПС, а также изолированного из белков наружных мембран антигенного препарата выявил присутствие в сенситине минимального количества 3-гидрокситетрадекановой кислоты - маркера присутствия ЛПС.

4. Для оценки специфичности и чувствительности разработанного полимерного псевдотуберкулезного антигенного диагностикума создана репрезентативная панель экспериментальных псевдотуберкулезных кроличьих сывороток к девяти сероварам, антигенному препарата белков наружной мембранны серовара O:1a, а также гетерологичных сывороток к близкородственным иерсиниям и другим бактериям.

5. Разработана технология получения псевдотуберкулезного видоспецифического антигенного полимерного диагностикума. Оптимальными условиями иммобилизации антигена и сенсибилизации носителя является антигенная нагрузка 1 мг/100 мг сфер, бикарбонатная буферная система (рН 9,2), носитель - окрашенные полимерные акролеиновые микросфера диаметром 1,5 мкм с реакционно-способными альдегидными группами.

6. Чувствительность полимерного антигенного псевдотуберкулезного диагностикума 86 %, специфичность 89 %, точность 87 %, диагностический титр антител для выявления псевдотуберкулеза у людей в РАО - 1:160.

### Практические рекомендации

1. У больных с симптомами, схожими с клиникой псевдотуберкулеза, рекомендуется определять титр специфических антител с помощью псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума. Выявление антител в титрах, превышающих 1:160, позволяет предположить у больного заболевание псевдотуберкулезом и нуждается в исследовании парной сыворотки (через 10-14 дней).

2. Разработанный «Диагностикум псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный сухой для РАО» может быть полезен при скрининговых исследованиях в эндемичных по псевдотуберкулезу районах.

3. Включение РАО в схему лабораторной диагностики псевдотуберкулеза позволит повысить достоверность результатов исследований.

4. Разработанная схема получения антигенного препарата может быть применима для выделения иммунодоминантных специфических антигенов из штаммов различных сероваров, вызывающих заболевание у человека.

### Перспективы дальнейшей разработки темы

Коллекция экспериментально полученных крольчих сывороток к девяти сероварам *Y. pseudotuberculosis* и препарату БНМ серовара O:1a (в количестве 40-50 мл каждой) может быть использована для изучения антигенной структуры возбудителя псевдотуберкулеза, выявления иммунодоминантных антигенов, оценки чувствительности и специфичности диагностических препаратов.

На основе разработанного экспериментального препарата целесообразно создание коммерческой тест-системы для лабораторной диагностики псевдотуберкулеза.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Карбышев, Г.Л. Изучение антигенной структуры *Yersinia pseudotuberculosis* с целью получения сенситина для конструирования видоспецифических диагностикумов / Г.Л. Карбышев, **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Терентьев, Л.К. Лысова, Е.М. Санамянц // Биотехнология. - 2011. - № 1. - С.77 - 85. (журнал из перечня ВАК)
2. **Симакова, Д.И.** Псевдотуберкулезный видоспецифический антигенный полимерный диагностикум. Принципы конструирования и результаты испытания / **Д.И. Симакова**, Г.Л. Карбышев, Л.В. Ларионова, А.Н. Терентьев, Л.К. Лысова, А.Н. Наркевич,

А.П. Кочеткова, Е.М. Санамянц // Биотехнология. - 2011. - № 3. - С. 88 - 95. (журнал из перечня ВАК)

3. **Симакова Д.И.** Применение метода газовой хромато-масс-спектрометрии для оценки сенситина полимерного антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Р.В. Писанов, М.В. Захаров, Л.В. Ларионова, Н.В. Павлович // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия «Естественные и технические науки». - 2018. - № 8. - С. 67 - 71. (журнал из перечня ВАК)

4. Патент на изобретение № 2430376, заявка 2010133423/15 от 09.08.2010. Способ получения псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума. **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, Г.Л. Карбышев, А.Н. Терентьев, Л.К. Лысова. Зарегистрировано 27 сентября 2011 г.

5. **Симакова, Д.И.** Изучение антигенной структуры *Y. pseudotuberculosis* различных серогрупп для конструирования видоспецифического антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, Л.К. Лысова, Г.Л. Карбышев, А.Н. Терентьев // Материалы IV международной конференции, посвященной 85-летию Санкт-Петербургского НИИЭМ имени Пастера и 120-летию Парижского института Пастера «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями». - СПб., 2008. - С. 101.

6. **Симакова, Д.И.** Изучение антигенной структуры *Y. pseudotuberculosis* различных сероваров / **Д.И. Симакова**, Г.Л. Карбышев, Л.В. Ларионова // Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины-2009». - СПб., 2009. - С. 89 - 90.

7. Карбышев, Г.Л. Конструирование псевдотуберкулезного видоспецифического полимерного диагностикума / Г.Л. Карбышев, **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Терентьев, А.П. Кочеткова, А.Н. Наркевич // Материалы научно-практической конференции, посвященной 75-летнему юбилею ФГУЗ Иркутск НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока «Современные аспекты эпиднадзора и профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней». - Иркутск, 2009. - С. 122 - 123.

8. Карбышев, Г.Л. Поиск видоспецифических антигенов у различных серологических вариантов *Y. pseudotuberculosis* с целью получения сенситина, перспективного для создания диагностических препаратов / Г.Л. Карбышев, **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Терентьев, Л.К. Лысова // Сборник докладов юбилейной научно-

практической конференции, посвященной 100-летию Ростовского НИИ микробиологии и паразитологии «Актуальные вопросы инфекционной патологии». - Ростов-на-Дону, 2009. - С. 281 - 285.

9. **Симакова, Д.И.** Совершенствование псевдотуберкулезных антигенных диагностических препаратов / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, Г.Л. Карбышев // Материалы научно-практической школы-конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности». - Оболенск, 2010. - С. 204 - 207.

10. **Симакова, Д.И.** Разработка антигенного полимерного диагностикума для серологической диагностики псевдотуберкулеза / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, Г.Л. Карбышев, А.Н. Терентьев // Материалы X межвузовской конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении (Дни медицинской лабораторной диагностики)». - Ростов-на-Дону, 2011. - С. 152 - 153.

11. **Симакова, Д.И.** Разработка антивидового псевдотуберкулезного диагностикума для выявления девяти сероваров *Y. pseudotuberculosis* / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, Г.Л. Карбышев, А.Н. Наркевич, Л.К. Лысова, А.Н. Терентьев // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекции, обусловленные иерсиниями». - СПб., 2011 - С. 95 - 97.

12. **Симакова, Д.И.** Разработка и создание псевдотуберкулезного полимерного антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина, Г.Л. Карбышев // Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней». - Новосибирск, 2013. - С. 151 - 152.

13. **Симакова, Д.И.** Разработка и создание псевдотуберкулезного полимерного антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина // Материалы научно-практической конференции, посвященной 80-летию Ростовского-на-Дону НИПЧИ «Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных болезней». - Ростов-на-Дону, 2014. - С. 178 - 181.

14. **Симакова, Д.И.** Конструирование псевдотуберкулезного полимерного видоспецифического антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина, Л.К. Лысова, А.П. Кочеткова // Материалы международной конференции «Общие угрозы - совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней». - М., 2015. - С. 351 - 353.

15. **Симакова, Д.И.** Разработка псевдотуберкулезного полимерного видоспецифического антигенного диагностикума / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина, Л.К. Лысова, А.П. Кочеткова // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены». - СПб., 2015. - С. 186 - 187.
16. Чемисова, О.С. Молекулярные методы типирования штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* / О.С. Чемисова, А.Л. Трухачев, **Д.И. Симакова**, А.С. Водопьянов, Н.В. Павлович, М.В. Полеева, Е.М. Санамянц // Материалы XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (ММСП) (2005 г.) до 2016 г.». - Саратов, 2016. - С. 272 - 274.
17. **Симакова, Д.И.** Поиск маркеров для совершенствования серологической диагностики псевдотуберкулеза / **Д.И. Симакова**, Л.В. Ларионова, О.С. Чемисова, М.В. Полеева, А.С. Водопьянов, А.Л. Трухачев // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены». - М., 2016. - С. 192 - 194.
18. Наркевич, А.Н. Стабильные полиакролеиновые микросфера для приготовления диагностических тест-систем / А.Н. Наркевич, **Д.И. Симакова**, Р.В. Писанов // Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». - СПб., 2017. - С. 440.
19. **Симакова, Д.И.** Типирование штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии / **Д.И. Симакова**, М.В. Полеева, О.С. Чемисова // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены». - Иркутск, 2017. - С. 128 - 129.
20. **Симакова, Д.И.** Применение газовой хромато-масс-спектрометрии для анализа антигенных препаратов *Y. pseudotuberculosis* / **Д.И. Симакова**, Р.В. Писанов, М.В. Захаров // Материалы XI научно-практической конференции, посвященной 115-летию ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» МЗ Краснодарского края

«Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России». - Краснодар, 2018. - С. 159 - 160.

21. **Симакова, Д.И.** Использование метода хромато-масс-спектрометрии при создании антигенных препаратов для серологической диагностики псевдотуберкулёза / **Д.И. Симакова**, Р.В. Писанов, Л.В. Ларионова, М.В. Захаров // Сборник трудов международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». - Минск, 2018. - С. 469 - 470.

22. **Симакова, Д.И.** Анализ состава жирных кислот антигенных препаратов *Yersinia pseudotuberculosis* / **Д.И. Симакова**, Р.В. Писанов, Л.В. Ларионова, М.В. Захаров // Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы». - М., 2018. - С. 202.

23. **Simakova, D.I.** The use of gas chromatography-mass spectrometry technology for assessing sensitin antigenic diagnosticums / **D.I. Simakova**, R.V. Pisanov, M.V. Zacharov, L.V. Larionova // United States - Japan Cooperative Medical Sciences Program 53rd Year Joint Panel Conference «Cholera & Other Bacterial Enteric Infections». - Hanoi, Vietnam, 2019. - P. 319.

24. База данных «Псевдотуберкулез». Свидетельство о регистрации № 2011620370 от 17 мая 2011. **Д.И. Симакова**, Г.Л. Карбышев, А.Н. Терентьев, Л.В. Ларионова, А.С. Водопьянов

### Список обозначений и сокращений

De - диагностическая точность; Se - диагностическая чувствительность; Sp - диагностическая специфичность; MALDI-ToF-MS- времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией; БНМ - белки наружной мембранны; ГИС - геоинформационная система; ГХМС - газожидкостная-хромато-масс-спектрометрия; ИФА - иммуноферментный анализ; ЖК - жирные кислоты; ЛПС – липополисахарид; МЖК с ЦПВ - музей живых культур с центром патогенных для человека вибрионов; мкм – микрометр; м.м. - молекулярная масса; НКС - нормальная кроличья сыворотка; ПААГ - полиакриламидный гель; РА - реакция агглютинации; РАО - реакция агломерации объемная; РНГА - реакция непрямой гемагглютинации; РТПГА - реакция торможения прямой гемагглютинации.