Наука та інновації. 2008. Т 4. № 3. С. 22–31.

А.А. Кабернюк[1], О.С. Олійник[1], Т.А. Редчук[1], С.І. Романюк[1], Д.В. Колибо[1], В.В. Євтушенко[2], О.В. Головач[3], С.О. Крамарєв[2], С.В. Комісаренко[1]

[1] Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ, Київ

[2] Кафедра дитячих інфекційних хвороб НМУ ім. О.О. Богомольця, Київ

[3] Київська міська дитяча клінічна інфекційна лікарня, Київ

РОЗРОБКА ІМУНОХІМІЧНИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПРОТИДИФТЕРІЙНОГО ІМУНІТЕТУ В ПОПУЛЯЦІЇ ЛЮДЕЙ

Розроблено тест-системи, які дають можливість швидко і ефективно оцінювати стан протидифтерійного імунітету. Представлено прототипи імунохімічних тест-систем на основі методів імуноферментного аналізу та імунохроматографії з використанням наночастинок колоїдного золота для оцінки рівня антитіл до субодиниць А та В дифтерійного токсину у сироватці крові людини. Як антигени використовувались рекомбінантні субодиниці дифтерійного токсину, що дало можливість визначити специфічність протидифтерійних антитіл в досліджуваних сироватках.

К л ю ч о в і с л о в а: дифтерія, оцінка протективного імунітету, рекомбінантні субодиниці дифтерійного токсину, імуноферментний аналіз, імунохроматографія.

ВСТУП

Дифтерія є небезпечним інфекційним захворюванням (особливо для дітей), яке супроводжується тяжкими ускладненнями з ураженням в першу чергу серцево-судинної і нервової систем, дихальних шляхів, печінки і нирок та характеризується досить високим рівнем летальності [1—4].

Протягом останньої епідемії у 1991—98 рр. в Україні було зареєстровано понад 19 000 випадків дифтерії, 696 з яких закінчилися летально [5]. Одними із основних чинників, які сприяли виникненню епідемії, експерти вважають відсутність адекватних методів моніторингу протидифтерійного імунітету, а також недоліки у проведенні імунізації населення, які призвели до зниження рівня колективного імунітету населення України.

Незважаючи на те, що протягом останніх років в Україні спостерігається зниження захворюваності на дифтерію (у 2002 р. було зареєстровано 285 випадків дифтерії, у 2003 р. — 158, в 2005 р. — 99, у 2006 р. — 52), рівень летальності залишається досить високим і складає 5—9 %. Зниження захворюваності не усуває ймовірності активізації дифтерії в майбутньому, тим більше, що існує певна циклічність спалахів цієї інфекції. Враховуючи, що поствакцинальний імунітет має антитоксичну спрямованість і не перешкоджає персистенції збудника та його розповсюдженню, й зважаючи на те, що в умовах відносного епідеміологічного благополуччя зростає кількість людей, які відмовляються від вакцинації, загроза збільшення ви-

© А.А. КАБЕРНЮК, О.С. ОЛІЙНИК, Т.А. РЕДЧУК, С.І. РОМАНЮК, Д.В. КОЛИБО, В.В. ЄВТУШЕНКО, О.В. ГОЛОВАЧ, С.О. КРАМАРЄВ, С.В. КОМІСАРЕНКО, 2008

падків захворювання на дифтерію стає цілком реальною.

У патогенезі захворювання провідну роль відіграє екзотоксин *Corynebacterium diphtheriae*. Дифтерійний токсин (ДТ) — це одноланцюговий білок з молекулярною масою 58 330, в якому виділяють два функціонально різних фрагменти: субодиницю А і В. Субодиниця В має рецепторзв'язувальний домен та домен, що відповідає за транслокацію токсину в клітину-мішень [6]. Токсична дія токсину обумовлена здатністю каталітичної субодиниці А, що має активність АДФ-рибозилтрансферази, блокувати синтез білка в клітинах еукаріот за рахунок рибозилювання фактору елонгації трансляції eEF2 по амінокислотному залишку дифтаміду (модифікованому гістидину). Поодинці субодиниці А чи В не здатні викликати загибель клітин. Ця властивість притаманна лише молекулі токсину в цілому.

Ефективність лікування дифтерії прямо залежить від своєчасно поставленого діагнозу та раннього застосування антитоксичної протидифтерійної сироватки. Проте бактеріологічний та серологічний методи діагностики, які зараз застосовуються в клінічній практиці, непридатні для швидкої діагностики цього захворювання. Основним методом діагностики є бактеріологічне дослідження, але воно дає змогу отримати результат не раніше, ніж за 48—72 години. Згідно з Протоколами діагностики та лікування інфекційних хвороб у дітей (наказ № 354 МОЗ України від 09.07.04 р.) встановлення титру антитоксинів методом РПГА (реакція пасивної гемаглютинації) проводиться всім хворим для визначення стану протидифтерійного імунітету при госпіталізації хворого та при спостереженні динаміки зростання титру антитіл. Високі титри протидифтерійних антитоксичних антитіл на початку захворювання можуть свідчити як про високий поствакцинальний імунітет, так і про контакт зі збудником. Зростання титру протидифтерійних антитіл у 4 і більше разів протягом 2-х тижнів свідчить про наявність інфекції. Однак методика РПГА для визначення антитіл до токсину *C. diphtheriae* є трудомісткою і потребує багато часу для його проведення. В РПГА оцінюється рівень антитіл до всієї молекули дифтерійного токсину, хоча відомо, що захисні властивості мають переважно антитіла до субодиниці В токсину [7, 8]. Крім того, введена хворим протидифтерійна сироватка крові коней може впливати на результати оцінки рівня антитоксичного імунітету хворого в РПГА. Ще одним недоліком існуючої методики є складність виконання та оцінки результатів.

Схильність людей до дифтерії обумовлюється рівнем протидифтерійного антитоксичного імунітету. Згідно з рекомендаціями МОЗ України вважається, що рівень антитоксину в концентрації 0,1 МО/мл (еквівалент титру 1 : 40 в РПГА) і вище є захисним. Основним засобом специфічної профілактики дифтерії вважається імунізація. З огляду на залежність ефективності лікування від ранньої діагностики, а також на необхідність контролю за станом протидифтерійного імунітету серед населення актуальним залишається питання розробки швидких та доступних серологічних методів діагностування.

Метою даної роботи є розробка імунохімічних тест-систем, які б давали можливість визначати рівень антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину в сироватці крові та вдосконалити оцінку протидифтерійного імунітету.

Своїм завданням ми ставили оптимізувати тест-системи для визначення антитіл до дифтерійного токсину і його субодиниць та порівняти отримані нами результати з даними, отриманими за допомогою традиційного методу РПГА для визначення антитоксичних антитіл у сироватках крові людей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дифтерійний токсин був люб'язно наданий професором Ю.Л. Радавським (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України).

Рекомбінантні субодиниці дифтерійного токсину були отримані нами, як описано раніше [9, 10].

Обстежені групи

Нами було використано 57 сироваток крові осіб, які не хворіли в минулому на дифтерію. 56 (98 %) пацієнтів були щеплені проти дифтерії вакцинами АКДП (адсорбована кашлюк, дифтерія, правець), АДП (адсорбована дифтерія, правець) чи АДП-М (адсорбована дифтерія, правець мінімізована) за національним календарем щеплень. Згідно анамнезу жоден з обстежених не хворів у минулому на дифтерію.

Дослідження рівня антитіл проти дифтерійного токсину у сироватках крові людей за допомогою реакції пасивної гемаглютинації

Рівень антитіл проти дифтерійного токсину у сироватках крові людей досліджувався за допомогою методу РПГА. Сироватки крові пацієнтів обстежували за допомогою тест-набору "Диагностикум эритроцитарный дифтерийный антигенный жидкий" (ОАО Биомед, РФ) згідно з інструкцією виробника.

Визначення рівня антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину у сироватках крові людини методом імуноферментного аналізу (ІФА)

Антигени розводили у забуференому фізіологічному розчині, який містив 0,8 % NaCl, 0,25 % KCl, 0,144 % Na_2HPO_4 та 0,024 % KH_2PO_4, pH 7,2) і наносили по 100 мкл на лунку у концентрації 5 мг/л. Сироватки у відповідних розведеннях вносили у забуференому фізіологічному розчині з додаванням 0,04 % Tween-20. Для виявлення сироваткових антитіл людини використовували кон'югат антитіл проти імуноглобулінів G людини з пероксидазою хрону, який також вносили у забуференому фізіологічному розчині з додаванням 0,04 % Tween-20 по 100 мкл на лунку. Усі розчини інкубували протягом години при температурі T = 37 °C. Перед внесенням кожного наступного розчину вміст лунок видаляли, а лунки тричі промивали дистильованою водою. Як хромоген-субстрат використовували ортофенілендиамін з 0,03 % H_2O_2. Через 20 хв після внесення розчину субстрату 100 мкл на лунку реакцію зупиняли внесенням в кожну лунку 50 мкл 2-молярного розчину сірчаної кислоти. Сигнал, отриманий в імуноферментному аналізі, вимірювали за допомогою ІФА рідера BIO-TEK ELx800 за довжини хвилі 490 нм.

Синтез кон'югата білка А *Staphylococcus aureus* з колоїдним золотом

Водний розчин золотохлорводневої кислоти, нагрітий до T = 60 °C, змішували з прогрітим до T = 60 °C розчином цитрату натрію, що містив танінову кислоту, до кінцевої концентрації золотохлорводневої кислоти — 0,01 %, натрій цитрату — 0,008 % і танінової кислоти — 0,000000087 %. Суміш інкубувати 60 хв при T = = 60 °C. Після цього розчин швидко охолоджували до 0 °C та додавали білок А до кінцевої концентрації 0,005 %. Через 20 хв додавали сироватковий альбумін бика (БСА) до кінцевої концентрації 5 %.

Визначення рівня антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину у сироватках крові людини методом імунохроматографії

Для розробки імунохроматографічної тест-системи було використано нітроцелюлозні мембрани Hi-Flow та набір для комплектації тест-систем Hi-Flow™ Plus Assembly Kit Plus виробництва фірми Millipore (США). Схематично будову тест-системи показано на рис. 1. Як видно, до складу тест-системи окрім нітроцелюлозної мембрани з іммобілізованим антигеном входить також смужка для кон'югата колоїдного золота з білком А, на яку наноситься проба досліджуваної сироватки, та адсорбуюча поверхня, що вбирає надлишок вологи під час руху проби та кон'югата в товщі мембрани. Для позитивного контролю наносили імуноглобуліни кроля, оскільки білок А добре взаємодіє з антитілами, для негативно-

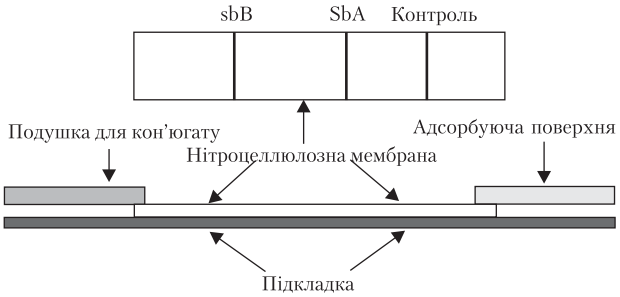


Рис. 1. Схема імунохроматографічної тест-системи

го контролю наносили сироватковий альбумін бика. Як антигени використовували рекомбінантні субодиниці А та В дифтерійного токсину. На смужку для кон'югата наносили 100 мкл вихідного розчину кон'югата колоїдного золота. Після нанесення кон'югата смужку доводили до повного висихання. Досліджувані сироватки пацієнтів використовували у розведенні 1 : 50. Смужки блокували 5%-ним розчином сухого знежиреного молока в забуференому фізіологічному розчині.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження рівня антитіл проти дифтерійного токсину проводили у сироватках крові людей за допомогою реакції пасивної гемаглютинації (РПГА).

Як видно з табл. 1, у більшості обстежених (84,2 %) були виявлені захисні титри антитоксичних антитіл (⩾1 : 40), у 12,3 % досліджених сироваток титр дорівнював 1 : 20, і у двох сироватках (3,5 %) антитіла не визначалися методом РПГА.

Таблиця 1

Рівень протидифтерійного імунітету в досліджуваних сироватках за даними РПГА

Титр	Кількість проб	%
0	2	3,5
1 : 20	7	12,3
1 : 40	21	36,8
1 : 80	18	31,6
1 : 160	9	15,8

Розробка імунохімічної тест-системи на основі методу імуноферментного аналізу для оцінки рівня антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину

При розробці імуноферментної тест-системи використовували розведення сироваток у 40, 80 та 160 раз (результати представлені у табл. 2). При розробці тест-системи показано, що рівень сигналу при використанні як антигену сироваткового альбуміну бика значно нижчий, ніж сигнали для нативного токсину та субодиниці В, та в переважній більшості випадків нижчий, ніж для субодиниці А. Отже, одержані в ІФА результати відображають рівень специфічних антитіл, обумовлених, напевне, попередньою імунізацією обстежених осіб дифтерійним анатоксином.

На рис. 2 наведено порівняння рівнів сигналу для кожної сироватки, отриманих методом імуноферментного аналізу, до двох антигенів: нативного дифтерійного токсину та рекомбінантної субодиниці В. Згідно з результатами статистичної обробки даних коефіцієнт кореляції між масивами даних, що характеризують рівень сигналу до цих антигенів, достатньо високий і складає 0,874.

Як відомо, протективними властивостями характеризуються переважно антитіла до субодиниці В, в той час як наявність антитіл до субодиниці А може свідчити про контакт зі збудником. Розроблена система дає можливість оцінити рівень антитіл до обох субодиниць дифтерійного токсину і тому дає більш вичерпну інформацію про стан протидифтерійного імунітету, аніж тести, які оцінюють титри антитіл до усієї молекули токсину.

За результатами імуноферментного аналізу рівень сигналу був найвищим при використанні дифтерійного токсину як антигену, а рівень сигналу для субодиниці В значно перевищував рівень сигналу для субодиниці А. На рис. 3 наведено діаграму, що показує середні рівні сигналу в ІФА для кожного з антигенів (ДТ, В- та А-субодиниць ДТ) при використан-

Таблиця 2

Результати дослідження рівня антитіл до нативного дифтерійного токсину та його субодиниць А і В у сироватках крові людей методом імуноферментного аналізу

№ сироватки	Субодиниця А			Субодиниця В			Дифтерійний токсин		
	розведення сироваток			розведення сироваток			розведення сироваток		
	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 40	1 : 80	1 : 160
3с	0,0358	0,0198	0,0068	0,2668	0,2448	0,1978	0,5878	0,1458	0,1138
10/2	0,0126	0,0086	0,0016	0,4866	0,3236	0,1736	0,6676	0,3096	0,1126
12/2	0,0376	0,0256	0,0026	0,3836	0,2466	0,1446	0,3526	0,1456	0,0626
9	0,1348	0,1058	0,0518	0,5738	0,2778	0,1328	0,8608	0,3918	0,2238
11	0,1788	0,0368	0,0208	0,2158	0,1208	0,0678	0,2618	0,0438	0,0318
29/2	0,1034	0,0584	0,0174	0,6144	0,3774	0,1944	0,8094	0,3584	0,1504
30/2	0,0264	0,0194	0,0104	1,1724	0,9014	0,5894	1,1374	0,7804	0,4874
13/2	0,0358	0,0398	0,0218	0,3488	0,2498	0,1318	1,1418	0,5448	0,2508
14/2	0,0358	0,0318	0,0568	0,7118	0,2408	0,1388	0,7228	0,6528	0,1868
20/2	0,0658	0,0508	0,0078	0,1638	0,1248	0,0868	0,1078	0,0408	0,0118
7/2	0,0216	0,0336	0,0126	0,1666	0,1166	0,0626	0,1256	0,0636	0,0246
9/2	0,0726	0,0386	0,0106	0,2786	0,1516	0,0796	0,2156	0,1406	0,0636
8/2	0,0586	0,0126	0,0146	0,2006	0,0906	0,0486	0,1646	0,0596	0,0156
1/2	0,0191	0,0271	0,0161	0,1141	0,1451	0,0491	0,1951	0,1351	0,0921
5/2	0,0841	0,0201	0,0141	0,9461	0,5301	0,2851	0,9921	0,4471	0,1511
25	0,0499	0,0079	0,0029	0,1989	0,1119	0,0859	0,1479	0,0459	0,0339
10	0,0289	0,0039	0	0,0929	0,0679	0,0309	0,1549	0,0659	0,0309
27	0,0249	0,0239	0,0039	0,1729	0,1069	0,0609	0,0619	0,0309	0,0149
14	0,1288	0,0208	0,0228	0,3028	0,2648	0,0988	0,4548	0,1588	0,0788
23/2	0,0294	0,0294	0,0064	0,3384	0,2044	0,1444	0,1084	0,0694	0,0304
24/2	0,0254	0,0124	0,0014	0,4874	0,3374	0,1574	0,8704	0,4784	0,2784
17/2	0,0648	0,0258	0,0018	0,2558	0,1408	0,0838	0,1518	0,0528	0,0378
19/2	0,0808	0,0158	0,0088	0,7438	0,4008	0,2188	0,7358	0,2128	0,0698
18/2	0,0088	0,0018	0	0,1168	0,1148	0,0538	0,0518	0,0078	0,0038
11/2	0,0126	0,0056	0,0026	0,0906	0,0526	0,0296	0,0636	0,0466	0,0176
3/2	0,1201	0,0301	0,0031	0,7491	0,4551	0,2421	0,7871	0,5551	0,2271
6/2	0,0771	0,0251	0,0091	0,2841	0,1691	0,0751	0,1801	0,0481	0,0191
6	0,0799	0,0519	0,0049	0,7789	0,4779	0,2579	0,8899	0,4729	0,1619
3	0,0769	0,0239	0,0279	0,5659	0,2719	0,1489	0,7989	0,2679	0,1249
13	0,1138	0,0548	0,0188	1,3628	1,1858	0,8318	1,2208	1,0468	0,8978
16	0,1808	0,0128	0,0368	0,4338	0,1888	0,1218	0,4968	0,2088	0,0928
21/2	0,0304	0,0574	0,0184	1,4074	1,2584	0,8974	1,3124	1,0074	0,8474
22/2	0,0524	0,0264	0,0544	0,7724	0,3794	0,1954	0,9784	0,6104	0,1944
2/2	0,0661	0,0201	0,0361	0,2241	0,1071	0,0621	0,3541	0,1811	0,0491
4/2	0,1421	0,0371	0,0031	0,4861	0,3261	0,1241	0,7851	0,2311	0,0911
2	0,0209	0,0359	0,0189	0,8429	0,4449	0,1809	1,1559	0,6109	0,3319

ні сироваток в розведенні 1 : 40. Сироватки поділено на чотири групи відповідно до їх титру в реакції пасивної гемаглютинації. Відповідно до інструкцій МОЗ України сироватки, які мають у РПГА титр 1 : 40, вважаються такими, що володіють захисним титром. Як видно з рис. 3, лише ті сироватки, що мали у реакції пасивної гемаглютинації титр 1 : 160, реагували у імуноферментному аналізі з достовірно вищими сигналами, ніж інші сироватки. Сироватки, що мали за результатами РПГА титри 1 : 20, 1 : 40 та 1 : 80, за результатами ІФА дос-

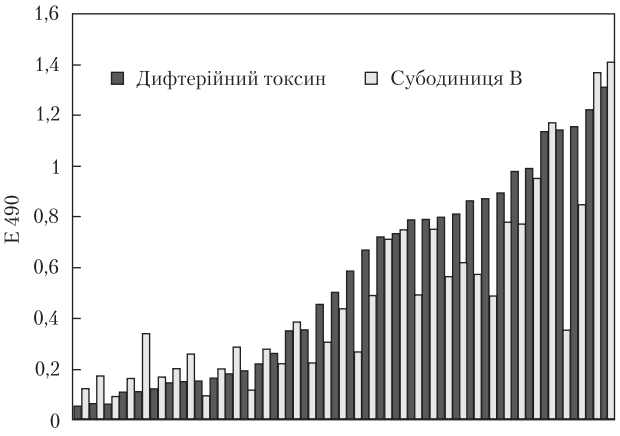


Рис. 2. Порівняння за допомогою методу ІФА рівнів відповіді до дифтерійного токсину та субодиниці В

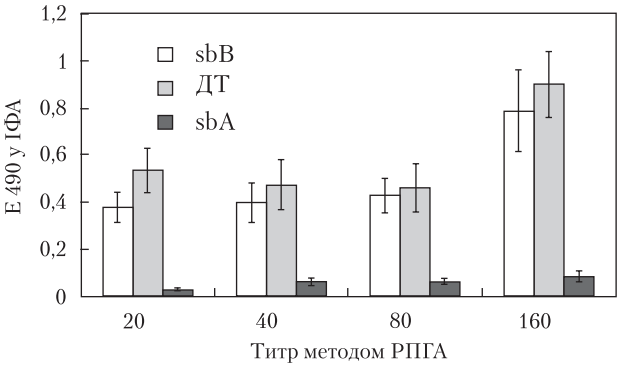


Рис. 3. Середні значення рівнів сигналу у ІФА до трьох антигенів (нативного токсину та його субодиниць А і В) для сироваток з різними титрами антитіл, визначеними за допомогою РПГА

товірно не відрізнялися. Водночас дані, отримані за допомогою ІФА, можна розглядати як більш коректні, оскільки РПГА має ряд істотних обмежень у порівнянні з імуноферментним аналізом. Так, найбільшими аглютинуючими властивостями в РПГА володіють антитіла класу М [11], які не можуть проявляти достатньої антитоксичної дії і характеризувати довготривалу імунну відповідь, а тому, на нашу думку, більш адекватним для оцінки стану протидифтерійного імунітету є вимірювання саме рівня антитіл класу G. Крім того, певний неспецифічний вклад у результати РПГА можуть вносити перехресні реакції антитіл (наприклад, поліреактивних антитіл) досліджуваних сироваток з еритроцитами барана, що входять до складу еритроцитарного тесту.

Синтез кон'югата білка А *Staphylococcus aureus* з колоїдним золотом

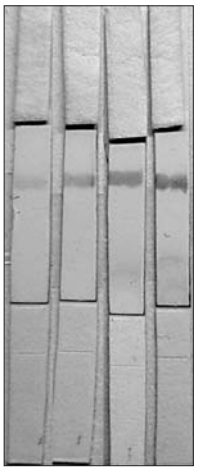
Імунохроматографічна система містить кон'югований з барвником один з реагентів для візуалізації комплексу *антиген—антитіло*, який свідчить про наявність компонента, що виявляється в досліджуваному матеріалі. Як барвники використовують різні субстанції, зокрема частинки колоїдного золота [12—19], вугілля [20] або системи з ферментною міткою [21] та відповідним хромогенним субстратом. Одним із завдань нашої роботи було отримання кон'югата колоїдного золота з білком А *Staphylococcus aureus* з необхідними властивостями. Кон'югацію проводили цитратним методом [22].

Нами було оптимізовано процедуру синтезу кон'югата колоїдного золота зі стафілококовим білком А та підібрано оптимальні концентрації золотохлорводневої кислоти, танінової кислоти та білка А. На рис. 4 наведено результати візуалізації смужки антитіл кон'югатами, що синтезовані з різними модифікаціями цитратного методу. Як видно, збільшення концентрації реагуючих речовин в цілому сприяло утворенню більш яскравого забарвлення, однак при цьому з'являлися фонові смуги, що є неприпустимим для роботи тест-системи. Використання розчину кон'югата білка А в 0,005%-ій концентрації давало кращі результати, ніж в 0,01%-ій концентрації. При підборі оптимальних умов синтезу отриманий кон'югат оцінювали не лише за результатами імунохроматографії, а також контролювали такі характеристики, як наявність нерозчинних конгломератів та максимум світлопоглинання синтезованого кон'югата.

Розробка імунохроматографічної тест-системи для оцінки рівня антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину

Було перевірено ряд нітроцелюлозних мембран: HF90, HF120, HF180, HF240 виробництва

Рис. 4. Виявлення антитіл кроля за допомогою кон'югатів колоїдного золота зі стафілококовим білком А, синтезованих з різними модифікаціями: *1* — концентрації золотохлорводневої кислоти 0,01 %, цитрату натрію 0,008 % і танінової кислоти 0,000000087 % білка А 0,01 %; *2* — концентрації золотохлорводневої кислоти 0,01 %, цитрату натрію 0,008 % і танінової кислоти 0,000000087 % білка А 0,005 %; *3* — концентрації золотохлорводневої кислоти 0,05%, цитрату натрію 0,04% і танінової кислоти 0,000000435 % білка А 0,01 %; *4* — концентрації золотохлорводневої кислоти 0,05 %, цитрату натрію 0,04 % і танінової кислоти 0,000000435 % білка А 0,005 %



1 2 3 4

1 2 3

Рис. 5. Дослідження впливу концентрації антигену на чутливість тест-системи: *1* — концентрація субодиниці В 500 мг/л; *2* — концентрація субодиниці В 50 мг/л; *3* — концентрація субодиниці В 5 мг/л

фірми Millipore (США), що відрізняються швидкістю протоку рідини (90, 120, 180 чи 240 с/4 см відповідно). Для подальшої роботи експериментальним шляхом було відібрано нітроцелюлозу HF120, яка давала найкращі результати за співвідношенням *швидкість протоку / інтенсивність забарвлення*.

Було також визначено мінімальну кількість антигену, яку достатньо сорбувати на нітроцелюлозну мембрану для ефективної візуалізації наявності антитіл в досліджуваних сироватках. Для цього антиген (субодиницю В дифтерійного токсину) наносили на мембрану у різних концентраціях (початкова концентрація 500 мг/л), зменшуючи з кожним кроком концентрацію у 10 разів. Для проявлення використовували сироватку крові миші, імунізованої рекомбінантними субодиницями А та В токсину.

Як видно з рис. 5, при зменшенні концентрації антигену чутливість системи падала, і при використанні антигену, розведеного в 100 разів, сироватка вже не виявляла смуги з антигеном. Було також (згідно з рекомендаціями виробника нітроцеллюлозних мембран, які були використані нами в роботі) перевірено доцільність блокування мембрани інертним білком. При порівнянні роботи імунохроматографічних систем із заблокованою та з незаблокованою мембранами виявилося, що етап блокування дає можливість дещо покращити роботу системи за рахунок зниження фонового сигналу.

Для аналізу наявності протидифтерійних антитіл ми використовували сироватку крові людини в розведенні 1 : 50, оскільки за цього розведення більшість сироваток з високим сигналом в ІФА (рівень сигналу ⩾0,3 за розведення 1 : 40) проявляли В-субодиницю ДТ в імунохроматографічному тесті. Для перевірки придатності тест-системи до використання як позитивний контроль запропонували наносити смужку пре-

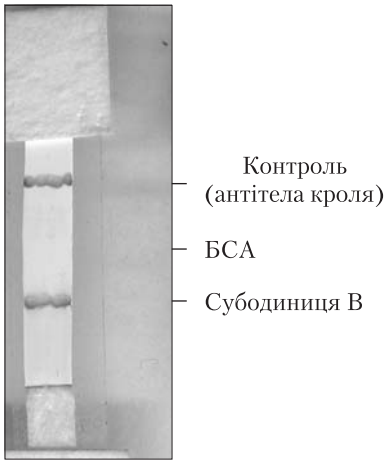


Рис. 6. Розпізнавання субодиниці В дифтерійного токсину та негативного (БСА) і позитивного (антитіла кроля) контрольних антигенів в розробленій імунохроматографічній системі

парату імуноглобулінів (концентрація 1 г/л). А для перевірки специфічності розробленої системи як негативний контроль використовували антиген — сироватковий альбумін бика (концентрація 2 г/л). На рис. 6 наведені результати роботи *"прототипу"* тест-системи. Як видно, сироватка, що була використана для перевірки тест-системи, специфічно проявляла дифтерійний антиген — субодиницю В токсину. Також проявлялася смуга позитивного контролю, а неспецифічний антиген (сироватковий альбумін бика) не виявлявся.

Таким чином, розроблена для контролю протидифтерійного імунітету імунохроматографічна тест-система має такий вигляд: на нітроцелюлозну мембрану нанесено смуги антигенів — рекомбінантної субодиниці А, рекомбінантної субодиниці В, а також смугу позитивного контролю (рис. 1). Для проведення аналізу необхідно нанести на подушку для кон'югата 50 мкл сироватки, розведеної у 50 разів забуференим

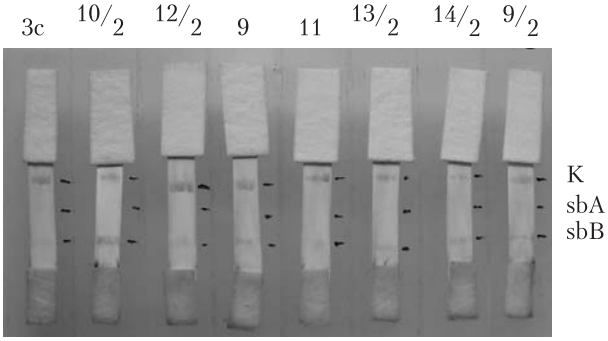


Рис. 7. Приклад аналізу декількох досліджуваних сироваток (3с, 10/2, 12/2, 9, 11, 13/2, 14/2, 9/2) за допомогою імунохроматографічної тест-системи

фізіологічним розчином з додаванням 0,04 % Tween-20, а потім внести ще 100—150 мкл забуференого фізіологічного розчину з додаванням 0,04 % Tween-20. Остаточні результати аналізу виявляються через 10 хв.

Отримані за допомогою розробленої імунохроматографічної тест-системи результати корелюють з результатами імуноферментного

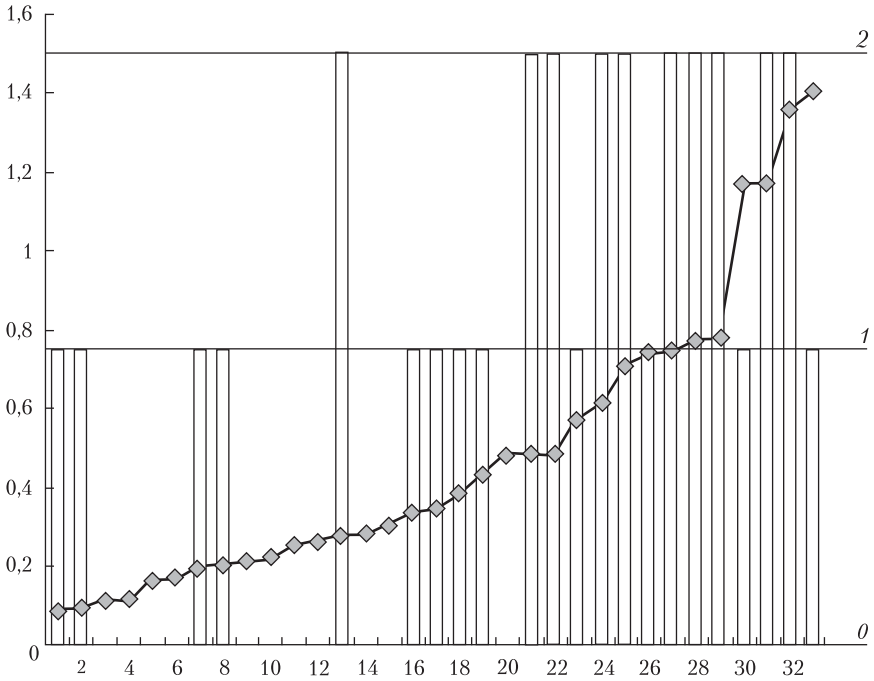


Рис. 8. Порівняння результатів імуноферментного аналізу та імунохроматографії. Графік відображає результати ІФА для кожної конкретної сироватки (відповідно значення по осі ординат — оптична густина при довжині хвилі 490 нм). Стовпчиками показано рівень сигналу в імунохроматографії для цих же сироваток, оцінений за трибальною шкалою: *0* — візуально не виявлялися, *1* — комплекс АГ—АТ візуалізується посередньо, *2* — яскрава візуалізація комплексу

аналізу. На рис. 7 наведено результати аналізу декількох з досліджуваних сироваток за допомогою створеної імунохроматографічної системи. Як видно з наведених на рисунку імунохроматограм, досліджені сироватки фактично не проявляли смугу субодиниці А, що співвідноситься з результатами імуноферментного аналізу, згідно з якими у досліджених сироватках рівень антитіл до субодиниці А був низьким. Результати, отримані за допомогою розробленої системи для субодиниці В, в цілому узгоджуються з результатами, отриманими методом імуноферментного аналізу (рис. 8).

Результати імунохроматографічного виявлення антитіл до досліджуваних антигенів оцінювали за трибальною шкалою (*0* — візуально не виявлялися, *1* — комплекс АГ—АТ візуалізується посередньо, *2* — візуалізація комплексу яскрава). Порівняння результатів імунохроматографії та ІФА показує, що серед сироваток з високим сигналом у ІФА (рівень сигналу $\geqslant$ 0,3 за розведення 1 : 40) 90 % сироваток дають реакцію забарвлення в імунохроматографічному тесті на рівні 1—2. Водночас серед сироваток з низьким рівнем сигналу в ІФА біля 30 % сироваток дають хибно-позитивну реакцію в імунохроматографічному тесті. Отже, на підставі аналізу масиву сироваток специфічність і чутливість розробленого імунохроматографічного тесту по відношенню до ІФА становила відповідно 66,7 % (10/15 × 100 %) і 89,5 % (17/19 × 100 %).

При виконанні даної роботи було розроблено прототипи імунохімічних тест-систем на основі імуноферментного аналізу та імунохроматографії для оцінки протидифтерійного імунітету. Розроблені тест-системи дозволяють оцінювати рівень антитіл до кожної з субодиниць дифтерійного токсину окремо, що має більше діагностичне значення, аніж дані про рівень антитіл до усієї молекули токсину, оскільки здатністю нейтралізувати дифтерійний токсин володіють переважно антитіла до субодиниці В. Як антигенні субстанції були використані рекомбінантні нетоксичні субодиниці дифтерійного токсину, продуцентами яких є трансформовані штами *Escherichia coli*, отримані нами раніше [9, 10].

При розробці імунохроматографічної тест-системи було оптимізовано компоненти тест-системи та методику синтезу кон'югата стафілококового білка А з колоїдним золотом для візуалізації комплексів *антиген—антитіло*. Використання розробленої нами тест-системи дає можливість отримувати результати аналізу приблизно за 10 хв. Система є простою у використанні і не потребує персоналу високої кваліфікації. Серед переваг розробленої системи можна також відмітити, що для постановки аналізу досить лише 1 мкл сироватки крові. Водночас слід визнати досить високий рівень хибно-позитивних результатів, що свідчить про необхідність подальшої роботи над вдосконаленням тест-системи.

Розроблена тест-система на основі імуноферментного аналізу дає можливість протягом кількох годин отримати вичерпну інформацію про рівні антитіл до окремих субодиниць дифтерійного токсину і може бути використана для оцінки стану протидифтерійного імунітету та при дослідженні динаміки зміни титру антитіл під час перебігу хвороби.

Впровадження в клінічну практику розроблених тест-систем на основі ІФА та імунохроматографії може покращити діагностику дифтерійної інфекції. Простота постановки тесту та швидкість отримання результатів збільшить ефективність діагностики і лікування хворих на дифтерію і підвищить якість контролю за протидифтерійним імунітетом населення.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Шлегель Г.* Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 567 с.
2. *Wiester M.J., Bonventre P.F., Grupp G.* Estimate of myocardial damage induced by diphtheria toxin. // J. Lab. Clin. Med. — 1973. — Vol. 81, P. 354—364.
3. *Bowman C.G., Imhoff J.G., Bonventre P.F.* Specificity of diphtheria toxin action on heart and muscle tissues of guinea pigs // Infect. Immun. — 1970. — Vol. 2, P. 686—688.
4. *Chin K.Y., Huang C.H.* Myocardial necrosis in diphtheria // Am. Heart. J. — 1941. — Vol. 22, P. 690—701.

5. *Деміховська О.В., Чудна Л.М.* Епідемія дифтерії в Україні: підсумки та узагальнення // Український медичний часопис. — 1999. — Т. 3(11), С. 56—58.
6. *Choe S., Bennett M.J., Fujii G.* The crystal structure of diphtheria toxin // Nature. — 1992. — Vol. 357, N 6375. — P. 216—222.
7. *Rolf J. M., Eidels L.* Structure-function analyses of diphtheria toxin by use of monoclonal antibodies // Infect Immun. — 1993 — Vol. 61(3), P. 994—1003.
8. *Rolf J. M., Eidels L.* Characterization of the diphtheria toxin receptor-binding domain // Mol. Microbiol. — 1993. — Vol. 7(4), P. 585—591.
9. Патент 23009 UA, 7 МПК A61K 39/44. Штам Escherichia coli K12 "inv" sbA — продуцент рекомбінантної неактивної субодиниці А дифтерійного токсину Corynebacterium diphtheriae / *С.В. Комисаренко, Д.В. Колибо, С.И. Романюк и др.* Опубл. 10.05.2007. Бюл. № 5.
10. Патент 22160 UA, 7 МПК A61K 39/44, 47/48. Штам Escherichia coli K12 "inv" sbB — продуцент рекомбінантної неактивної субодиниці В дифтерійного токсину Corynebacterium diphtheriae / *С.В. Комисаренко, Д.В. Колибо, С.И. Романюк и др.* Опубл. 10.04.2007. Бюл. № 4.
11. Антитела. Методы: Кн.1 / Под ред. Д. Кетти. — М.: Мир, 1991. — 287с.
12. *Degushi M., Yamashita N., Kagita M., Nakano T.* Evaluation of four immunochromatography assay methods for HBs antigen detection // JJCLA. — 2000. — Vol. 25, P. 707—709.
13. *Dykman L.A., Matora L.Yu., Bogatyrev V.A.* Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies // J. Microbiol. Meth. — 1996. — Vol. 24, P. 247—248.
14. *Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Melnikov A.G.* Spectral extinction of colloidal gold and its biospecific conjugates // J. Coll. Interf. Sci. — 1996. — Vol. 180, P. 436—445.
15. *Дыкман Л.А., Богатырев В.А.* Коллоидное золото в твердофазных методах анализа // Биохимия. — 1997. — Т. 6, С. 411—418.
16. *Holgate C.S., Jacson P., Pollard K., Lunny D.* Effect fixation on T and B lymphocyte surface membrane antigen demonstration in paraffin processed tissue // J. Pathol. — 1986. — Vol. 149(4), P. 293—300.
17. *Ellis I.O., Bell J., Bancroft J.D.* Polarized incident light microscopical enhancement of immunogold and immunogold-silver preparations: its role in immunohistology // J. Pathol. — 1989. — Vol. 159, P 6—13.
18. *Nato F., Bontannier A., Rajerison M., Grosjean P.* One-step immunochromatographic dipstick test for rapid detection of vibrio cholerae O1 and O139 in stool samples // Clin. Diagn. Lab. Immunol. — 2003. — Vol. 10(3). — P. 476—478.
19. *Энглер К.Х., Норн Д., Козлов Р.С., и др.* Быстрые фенотипические методы определения дифтерийного токсина у клинических штаммов коринобактерий // КМАХ. — 2001. — Т 3, С. 82—92.
20. *Lonnberg M., Carlsson J.* Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of flatbed scanner // Anal. Biochem. — 2001. — Vol. 293(2), P. 224—231.
21. *Ono T., Kawamura M., Arao S., Nariuchi H.* A highly sensitive quantitative immunochromatography assay for antigen specific IgE // J. Immunological methods. — 2003. — Vol. 272(1-2), P. 211—218.
22. *Horisberger M, Clerc M.F.* Labelling of colloidal gold with protein A. A quantitative study // Histochemistry. — 1985. — Vol. 82(3), P. 219—223.

А.А. Кабернюк, Е.С. Олейник, Т.А. Редчук, С.И. Романюк, Д.В. Колибо, В.В. Евтушенко, Е.В. Головач, С.А. Крамарев, С.В. Комисаренко

РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПРОТИВОДИФТЕРИЙНОГО ИММУНИТЕТА В ПОПУЛЯЦИИ ЛЮДЕЙ

Разработаны тест-системы, позволяющие быстро и эффективно оценивать состояние противодифтерийного иммунитета. Представлены прототипы иммунохимических тест-систем на основе методов иммуноферментного анализа и иммунохроматографии с использованием наночастиц коллоидного золота для оценки уровня антител к субъединицам А и В дифтерийного токсина в сыворотке крови человека. В качестве антигенов использовались рекомбинантные субъединицы дифтерийного токсина, что позволило определить специфичность противодифтерийных антител в исследуемых сыворотках.

Ключевые слова: дифтерия, оценка протективного иммунитета, рекомбинантные субъединицы дифтерийного токсина, иммуноферментный анализ, иммунохроматография.

A.A. Kaberniuk, O.S. Oliinyk, T.A. Redchuk, S.I. Romanyuk, D.V. Kolibo, V.V. Ievtushenko, O.V. Golovach, S.O. Kramarev, S.V. Komisarenko

DEVELOPMENT OF IMMUNOCHEMICAL TEST SYSTEMS FOR ANTI-DIPHTHERIA IMMUNITY CONTROL IN POPULATION OF PEOPLE

Diagnostic test-systems for rapid and effective assessment of antidiphtheria immunity are developed. The prototypes of immunochemical test-systems based on enzyme-linked immunosorbent and immunochromatographic assays for detection of antibodies to diphtheria toxin subunits A and B in human serum are presented. It was suggested to use recombinant subunits of diphtheria toxin as antigens that allowed to define the specificity of anti-diphtheria antibodies in human sera.

Key words: diphtheria, protective immunity evaluation, diphtheria toxin's recombinant subunits, elisa, immunochromatography.

Надійшла до редакції 31.08.07.