

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БРУЦЕЛЛЕЗА В НЕПРЯМОМ МЕТОДЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Курчева С. А., Тюменцева И. С., Афанасьев Е. Н., Жданова Е. В., Старцева О. Л., Жарникова И. В., Гаркуша Ю. Ю., Семирчева А. А.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, e-mail: kurcheva@yandex.ru

Анализ сравнительных данных об особенностях течения бруцеллеза позволяет утверждать, что бруцеллез у людей в последнее десятилетие приобрел менее манифестное течение, что затрудняет его диагностику. В таких случаях чрезвычайно актуальными остаются лабораторные методы исследования этой инфекции. Это подчеркивает необходимость совершенствования и разработки новых, более чувствительных и специфических диагностических средств, особенно предполагающих экспресс-тестирование и инструментальный учет результатов тестов.

Разработана диагностическая тест-система для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза в непрямом методе иммуноферментного анализа при исследовании биологического материала от людей и оптимизированы условия её постановки. Приведены результаты, свидетельствующие о достаточно высокой специфичности и чувствительности тест-системы, что позволяет предложить её для рутинной диагностики бруцеллеза в качестве дополнительного или альтернативного теста.

Ключевые слова: диагностика, бруцеллез, антитела, ИФА, тест-система, сыворотка, конъюгат.

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEM FOR DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO PATHOGENS BRUCELLOSIS IN INDIRECT METHOD OF ENZYME IMMUNOASSAY

Kurcheva S. A., Tyumentseva I. S., Afanasiev E. N., Zhdanova E. V., Startseva O. L., Zharnikova I. V., Garkusha Y. Y., Semircheva A. A.

FGHI Stavropol plague control institute of the Rosпотребнадзор, Stavropol, e-mail: kurcheva@yandex.ru

Based on analysis of comparative data on peculiarities of brucellosis progression, an assertion can be made that in the latest decade brucellosis in people has been less symptomatic which impedes its diagnostics. In such cases laboratory methods of studying this infection are utterly important. This confirms the importance of improving and developing new, more sensitive and specific means of diagnostics, especially those for rapid testing and instrumental account of test results. A diagnostic test system has been developed for detection of specific antibodies to brucellosis pathogens in indirect enzyme immunoassay in the course of study of human biological material, and the conditions for its application have been optimized. The results are presented to demonstrate that the test system is fairly specific and sensitive, which allows proposing it for routine diagnostics of brucellosis as a complementary or alternative test method.

Keywords: diagnostics, brucellosis, antibodies, enzyme immunoassay, test system, serum, conjugate.

Бруцеллез – бактериальная инфекционно-аллергическая болезнь, относящаяся к группе зоонозов и занимающая особое положение среди других инфекционных болезней из-за своеобразия возбудителя. Этиопатогенетические особенности бруцеллеза определяют большую склонность заболевания к хроническому течению с длительной персистенцией патогена. Фактор времени не играет абсолютной роли в определении формы или стадии болезни, так острый процесс может развиваться на фоне латентного бруцеллеза, а хроническое течение может развиваться с самого начала болезни. Как правило, после

консультации инфекциониста для исключения возможного бруцеллеза кровь пациента тестируют только в реакциях Хеддельсона и Райта, обладающих, по информации ряда авторов, невысокой чувствительностью (35–64 %). Из современных серологических методов диагностики бруцеллеза иммуноферментный анализ (ИФА) является наиболее доступным и распространенным [2, 3, 4]. Явные преимущества этого теста – простота и быстрота выполнения, высокая чувствительность, стабильность реагентов, возможность количественного учета реакции, обработка большого количества проб, автоматизация процесса и объективность инструментального учета результатов [5]. Метод иммуноферментного анализа находится в постоянном развитии. С одной стороны, расширяется число объектов исследования, с другой – углубляются и совершенствуются методы самого анализа [7]. Специфичность и чувствительность ИФА зависит от качества используемых иммунореагентов и оптимизации постановки теста.

Целью настоящей работы стало изучение возможности выявления антител в сыворотках крови людей при хроническом течении бруцеллеза в иммуноферментном анализе.

Проведя анализ полученных результатов, нами была сконструирована экспериментальная тест-система диагностическая для выявления специфических антител в сыворотках крови больных острым и хроническим бруцеллезом в непрямом методе постановки иммуноферментного анализа (ИФА).

Материалы и методы

В качестве сенсibilизирующего агента был апробирован поливалентный бруцеллезный водорастворимый антиген (Аг-в/р), извлеченный по методу Е. Н. Афанасьева из смеси бакмасс *Brucella (B.) abortus*19АВВ, *melitensis*Rev-1, *B. suis*61, обеззараженных охлажденным до минус 20 °С ацетоном [1].

Для получения кроличьей сыворотки против Ig G человека проводили гипериммунизацию по схеме, разработанной И. С. Тюменцевой с соавторами [6]. Схема основана на подборе оптимальной комбинации интактных и полимеризованных Ig G, выделенных из нормальной сыворотки крови человека, а также иммуномодуляторов тималина и циклофосфана. В качестве доноров антивидовых IgG были взяты кролики породы «Шиншилла», массой 3–3,5 кг. Гипериммунизацию проводили с соблюдением видоидентичности антигенов и вида продуцентов, используя IgG, выделенные из нормальной сыворотки крови человека, и иммуномодуляторы тималин и циклофосфан.

Конъюгацию кроличьих Ат против Ig G человека с индикаторным ферментом – пероксидазой хрена (ПХ) (тип VI-A, Rz: ~3.0 с активностью 1550 units/mg (Sigma))

проводили по методу периодатного окисления по Р. К. Nakane, А. Kawaoi (1974) в модификации М. В. Wilson, Р. К. Nakane (1978).

Результаты ИФА регистрировали с помощью фотометра «Multiskan FC», измеряя оптическую плотность (ОП), используя фильтр с длиной волны 450 нм. По результатам ОП рассчитывали значение критической оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле 1:

$$ОП_{крит.} = ОП_{cp} K + 0,2 \quad (1),$$

где $ОП_{cp}K$ – среднее значение ОП для отрицательного контрольного образца.

Для интерпретации результатов исследования применяли коэффициент позитивности (КП):

$$КП = ОП_{иссл. сыв.} / ОП_{крит.} \quad (2).$$

При $КП < 1,0$ результат оценивается как отрицательный.

$КП \geq 1,0$ – результат положительный.

Для определения диагностической ценности сконструированной тест-системы использовали сыворотки крови больных и здоровых людей.

В качестве твердой фазы – полистироловые планшеты фирмы «Costar» (USA).

Результаты и обсуждение

Основные параметры ИФА, а именно чувствительность, точность и воспроизводимость, могут существенно изменяться при варьировании условий проведения эксперимента (температура, ионная сила и рН реакционной среды, концентрационные соотношения компонентов и продолжительность их взаимодействия). Это определяет необходимость оптимизации каждой стадии анализа, для чего использовали эмпирический подбор параметров постановки теста.

При создании диагностического теста важным моментом является определение его антигенной композиции и условий адсорбции на твердой фазе, т. е. установление оптимальной концентрации антигена (Аг), состава сенсibiliзирующего буфера, условий отмывания не связавшихся компонентов, времени и температуры связывания Аг с поверхностью полистироловых планшетов. Оптимальную сенсibiliзирующую дозу бактериального агента определяли в серии опытов с сыворотками крови больных бруцеллезом и здоровых людей против иммуноглобулинового пероксидазного конъюгата. В экспериментах испытывали различные концентрации Аг в интервале $10 \div 300$ мкг/мл. Процесс адсорбции Аг оценивали по интенсивности реакции с контрольными сыворотками крови людей. Наиболее оптимальный уровень насыщения поверхности планшет достигался при концентрации белка, равной 100 мкг/мл, при этом сыворотки здоровых людей реагировали отрицательно.

Для определения оптимальных условий сенсibiliзации планшета Аг-в/р оценивали интенсивность реакции при инкубации в термостате (37 ± 1) °С в течение (3, 2, 1 ч) и с

использованием термошейкера при той же температуре (250 об./мин), а также 18 ч при температуре 4 °С (рисунок 1). Установлен оптимальный режим – при температуре 37 °С в течение 2 ч или в условиях термошейкера в течение 1 ч, в то время как при остальных значениях выдержки адсорбционная способность Ag-в/р, а также специфичность реакции несколько ниже. Инкубация при температуре 4 °С возможна при определенных условиях расчета времени постановки реакции без потери чувствительности и специфичности.

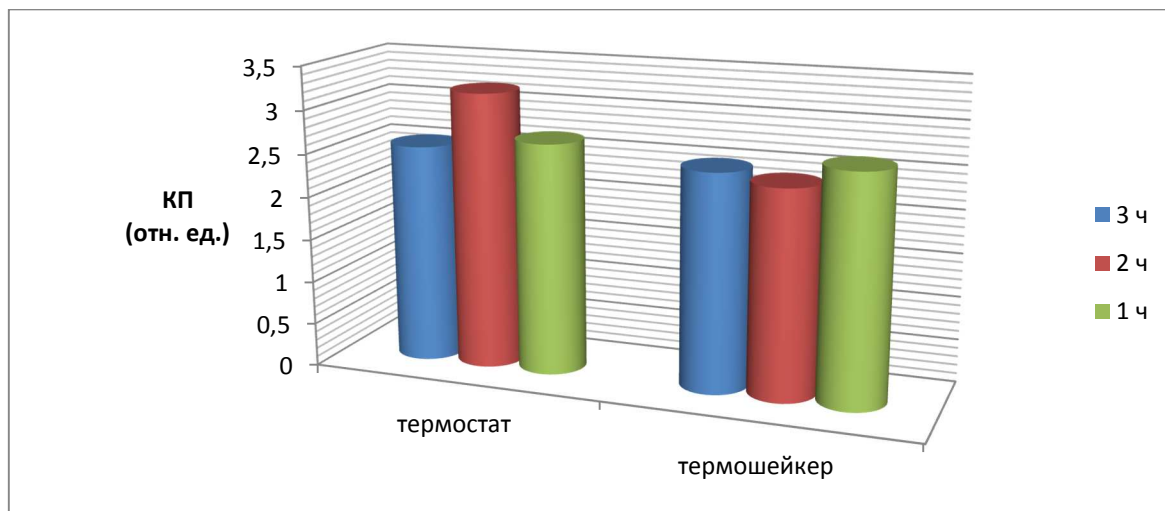


Рис.1. Зависимость КП от изменения условий инкубации

Чтобы исключить неспецифическую реакцию на иммунный комплекс Ag-Аг, были проведены исследования по уменьшению «фоновых помех» с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА) и казеина в концентрации 0,05–1,0 % в буфере для разведения сывороток крови людей и иммуноглобулинового пероксидазного конъюгата. Установлено, что блокирование свободных центров связывания целесообразно проводить 0,1 % раствором БСА на ФСБ рН $7,2 \pm 0,2$ с добавлением неионного детергента Твин 20 до 0,05 %.

Далее были изучены особенности взаимодействия опытных сывороток крови с иммобилизованным на поверхности полистирола специфическим Ag-в/р с в интервале от 15 до 90 мин при температуре 37 °С и иммунопероксидазным конъюгатом (15; 30 и 40 мин). Как показано на графике (рисунок 2), оптимальное время инкубации сывороток – 60 мин, а инкубацию иммунопероксидазного конъюгата – 30 мин. В более короткий срок – не происходит эффективного взаимодействия компонентов реакции, а увеличение продолжительности инкубации не только удлиняет время постановки реакции, но и способствует появлению фонового окрашивания.

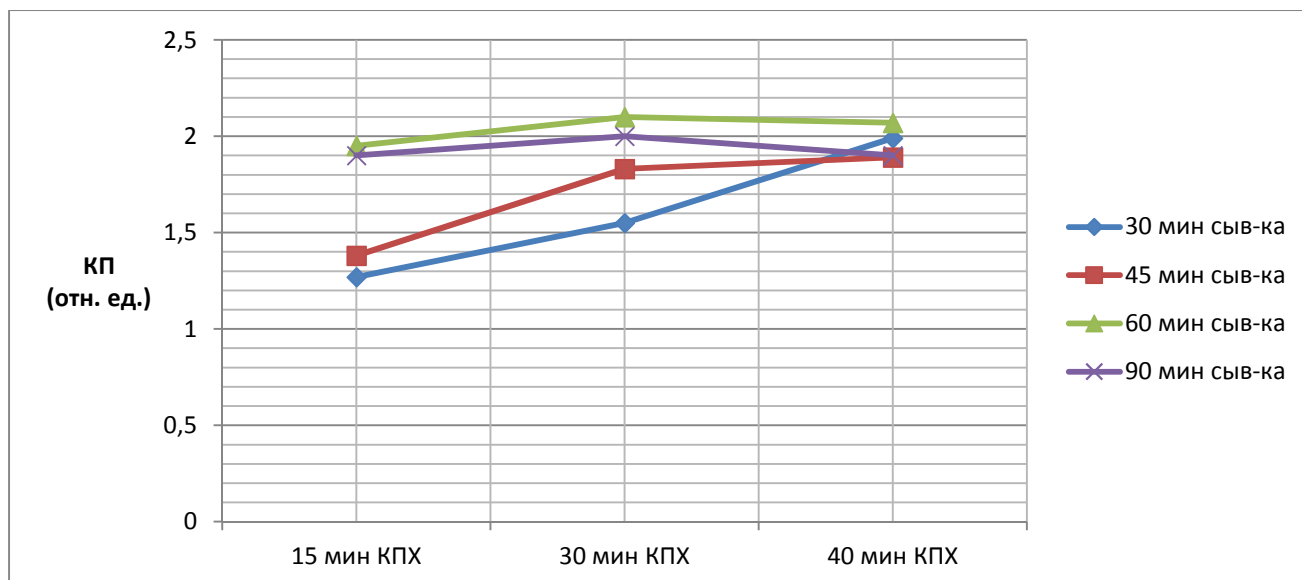


Рис. 2. Зависимость показаний КП от времени инкубации сыворотки и иммуноглобулинового пероксидазного конъюгата

Важным для проведения ИФА является определение кинетики связывания и концентрации пероксидазного конъюгата. В опытах максимальные значения были констатированы при рабочем разведении конъюгата 1:3000 при его взаимодействии с испытуемыми сыворотками – 30 минут при температуре 37 °С.

При испытании чувствительности тест-системы использовали различные разведения (от 1:10 до 1:100) сывороток крови больных острым и хроническим бруцеллезом, которые вносили в лунки планшет сенсibilизированных Ag-в/р. Постановка реакции осуществлялась согласно отработанным параметрам. Чувствительность выявления специфических антител оценивали по средней величине КП. Среднее значение КП при разведении сыворотки 1:10 составляет $2,140 \pm 0,129$ при разведении сыворотки 1:100 – $2,658 \pm 0,221$. Число степеней свободы (f) = 13. Парный t-критерий Стьюдента = 3689. Критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 2,16. $t_{\text{набл.}} > t_{\text{крит.}}$, изменения признака статистически значимы ($p < 0,05$).

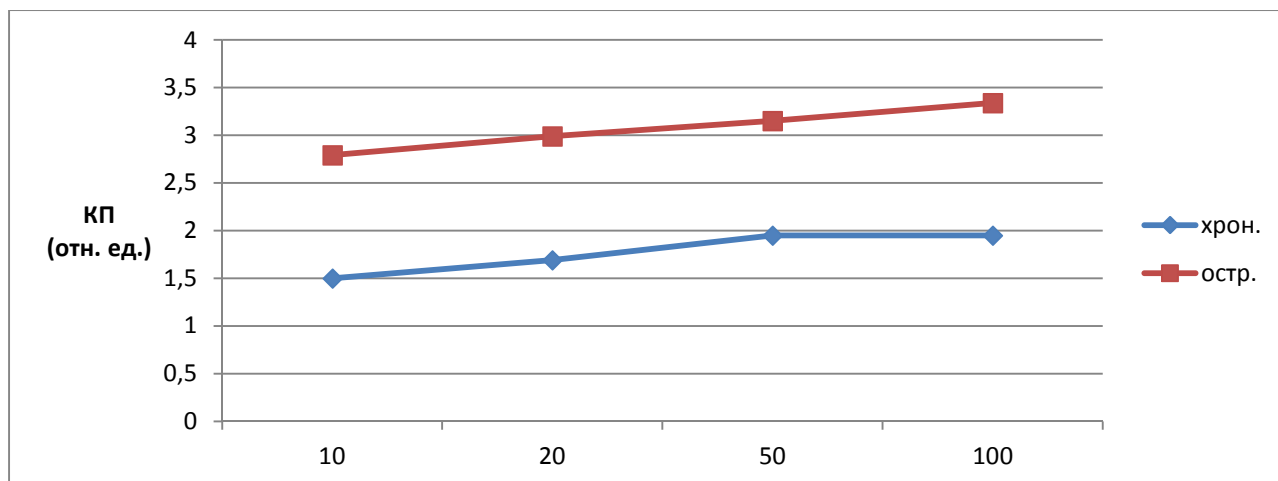


Рис. 3. Зависимость показаний коэффициента позитивности от разведения сыворотки

Проведенные исследования позволили сконструировать диагностический набор реагентов тест-систему диагностическую для выявления антител к возбудителю бруцеллеза в нИФА (экспериментальные серии). В состав набора входят следующие компоненты: положительный контроль (инактивированный) – 1 ампула (0,1 мл); конъюгатпероксидазный иммуноглобулиновый сухой – 1 ампула (0,1 мл); антиген бруцеллезного микроба (полигрупповой) в концентрации 10,0 мг/мл сухой 1 ампула (0,25 мл); фосфатно-солевой буфер (ФСБ), сухая навеска – 1 флакон; бычий сывороточный альбумин (БСА), сухая навеска – 1 флакон; твин 20 – 1 флакон; тетраметилбензидин (ТМБ) – 2 флакона; 4 N раствор серной кислоты (стоп-реагент) – 1 флакон; планшет полистироловый для ИФА однократного применения с объемом лунки 0,4 мл – 1 шт.; скарификатор дисковый ампульный керамический – 1 шт.

Способность тест-системы выявлять антитела к возбудителю бруцеллеза при различных формах заболевания была показана в нИФА с 24 сыворотками больных бруцеллезом людей (рисунок 4). Значения КП при острой форме бруцеллеза в основном более 2,0 (средняя арифметическая – $2,86 \pm 0,22$), при хронической форме значения лежат в диапазоне от 1,0 до 2,0 (средняя арифметическая – $1,53 \pm 0,10$). Значения t-критерия Стьюдента: 5,50. Различия статистически значимы ($p < 0,05$). Число степеней свободы $f=23$. Критическое значение t-критерия Стьюдента = 2,069.

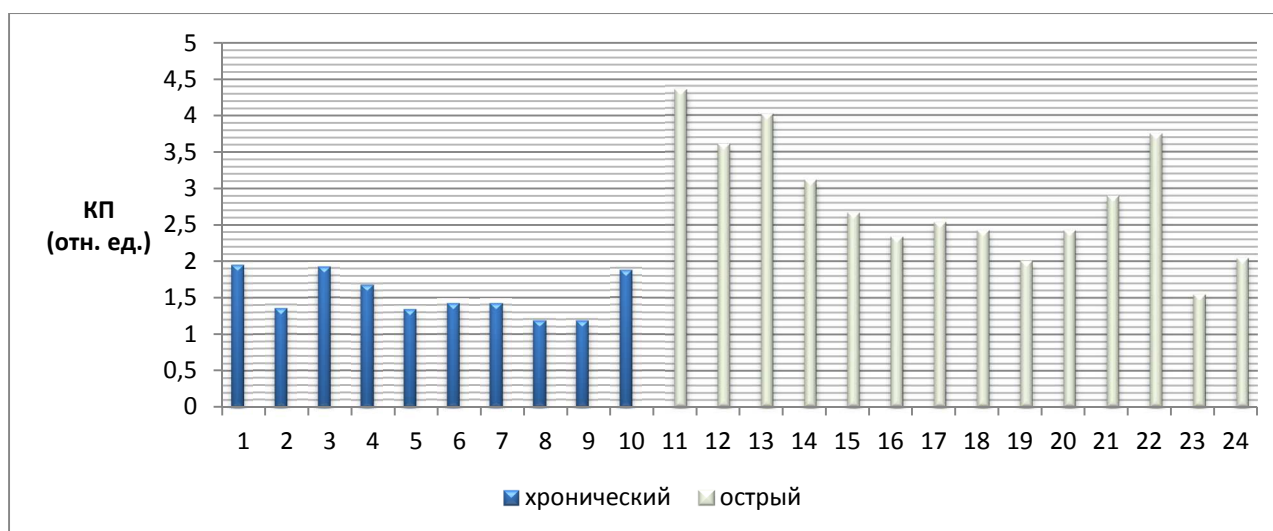


Рис. 4. Значения КП при различных формах бруцеллеза (1–10 – сыворотки крови больных хронической формой бруцеллеза; 11–24 – сыворотки крови больных острой формой)

При испытании разработанная тест-система позволяла выявлять антитела к возбудителю бруцеллеза при различных формах заболевания. При этом отмечали отрицательную реакцию с сыворотками крови здоровых людей.

Выводы

В результате проведенных исследований разработана тест-система для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза на основе непрямого метода иммуноферментного анализа.

Установлены оптимальные параметры и условия постановки ИФА с разработанной тест-системой: сенсibilизация планшет раствором поливалентного бруцеллезного водорастворимого Аг в 0,1М ФСБ, рН 7,2±0,2 с концентрацией белка 100 мкг/мл в течение 2 ч при температуре 37 °С или 1 ч в условиях термошейкера (250 об/мин; 37 °С); блокировка свободных сайтов связывания – буферным раствором 0,1 % БСА в присутствии неионного детергентадо 0,05 %; взаимодействие сывороток со специфическим Аг – 60 мин при 37 °С; время экспозиции с иммунопероксидазным конъюгатом – 30 мин при температуре 37 °С.

Таким образом, результатом проведенных исследований стала разработка тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза, позволяющая в течение 3–4 часов (включая предварительную сенсibilизацию) определить наличие их антител в сыворотках крови больных острой и хронической формой бруцеллеза.

В результате испытаний установлены высокая активность и специфичность тест-систем для выявления специфических антител к возбудителю бруцеллеза в сыворотках крови людей, что позволяет предложить их в качестве альтернативного теста в лабораторной диагностике бруцеллеза.

Список литературы

1. Афанасьев Е. Н. Сравнительная характеристика антигенной структуры бактерий рода *Brucella*: дис. ... канд. мед. наук. – Ставрополь, 1983. – 173 с.
2. Конструирование тест-системы диагностической для выявления антител к возбудителю бруцеллеза в непрямом методе иммуноферментного анализа / С. А. Курчева, О. Л. Старцева, А. А. Семирчева, Э. В. Криницына // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских организаций Роспотребнадзора (22–24 октября 2014 г.), 2014. – С. 127–128.
3. Криницына Э. В., Крюкова О. С. Наборы регентов ЗАО «Вектор-Бест» для серологической диагностики бруцеллеза // Новости «Вектор-Бест». – № 4 (70). – 2013: http://www.vector-best.ru/nvb/n70/st70_1.htm ; дата обращения: 06.11.14.
4. Оценка иммунного статуса и дифференцированная иммунокоррекция при бруцеллезе / Г. М. Курманова, А. К. Дуйсенова, К. Б. Курманова, Н. Х. Спиричева // Методические рекомендации. – Алматы, 2002. – 30 с.
5. Разработка и оптимизация условий постановки тест-системы для диагностики бешенства сэндвич методом твердофазного иммуноферментного анализа / Е. С. Жилин, Ж. К. Кошеметов, В. М. Матвеева, А. Т. Татыбаева [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://flatik.ru/e-s-jilin-j-k-koshemetov-v-m-matveeva-a-t-tatibaeva> (дата обращения: 02.03.2016).
6. Тюменцева И. С., Афанасьев Е. Н., Ефременко В. И., Базиков И. А., Алиева Е. В. Способ получения диагностической сыворотки // Патент на изобретение № 2135210. – 1999.
7. Яснева Е. А., Константинов А. В. Оптимизация условий постановки непрямого варианта иммуноферментного анализа для определения антител на штаммы «ВК» и «К» вируса болезни Ауески в сыворотках крови свиней // Ветеринарная патология. – 2007. – № 4. – С. 51–55.