

УДК 571.27 + 57.083.322 + 616-056.3

О. Галкін, канд. біол. наук, М. Михальчук, студ.
Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут", Київ,
В. Казмірчук, д-р мед. наук
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ,
Ю. Гурженко, д-р мед. наук
Інститут урології НАМН України, Київ

РОЗРОБКА І ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РІЗНИХ МОДИФІКАЦІЙ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ІgE-АНТИТІЛ

Розробка та порівняльне дослідження різних модифікацій імуноферментного аналізу (ІФА) для визначення специфічних ІgE-антитіл. Біохімічний синтез кон'югатів антитіл та антигенів, ІФА. Проведено теоретичне обґрунтування доцільності використання ІФА для виявлення специфічних ІgE-антитіл; здійснено наукову розробку та порівняльну характеристику двох модифікацій ІФА для виявлення специфічних імуноглобулінів класу ІgE до профіліну пилку берези Bet v 2 та білку теплового шоку Chlamydia trachomatis HSP-60: непрямого варіанту й ІgE-"пастки" (з і без використання системи авідин-біотинового підсилення сигналу). Доведено, що за показниками інформативності аналізу (специфічність, чутливість, відтворюваність) непрямий ІФА не забезпечує ефективне визначення специфічних ІgE-антитіл; показано, що модифікація ІФА ІgE-"пастка" характеризується задовільними аналітичними показниками аналізу як з, так і без авідин-біотинового підсилення сигналу.

Ключові слова: ІgE, антитіла, імуноферментний аналіз, алергени.

Вступ. Алергічними захворюваннями (АЗ) страждає від 10% до 30% населення Землі [1-3]. Дослідження останніх 30 років показали, що поширеність алергопатології у світі безперервно збільшується [4]. Для України частота АЗ в середньому у 30% населення залежно від стану природного навколишнього середовища, клімату, розвитку виробництва у певних регіонах [5].

Роль імунної системи полягає в захисті організму від патогенних бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів. Захисна реакція необхідна для забезпечення опірності організму при початковому контакті з патогенами, а також виробленні специфічної імунної відповіді. Всім алергічним реакціям (гіперчутливість негайного типу) передують безсимптомна фаза початкового контакту, під час якої утворюються специфічні імуноглобуліни класу Е (ІgE-антитіла). При повторному контакті з алергенами, що запускають реакцію, ці ІgE-антитіла реагують з алергенами і призводять до вивільнення медіаторів (з опасистих клітин або мастоцитів), таких як гістамін, лейкотрієни, простагландини тощо, які призводять до розвитку симптомів алергії [6, 7].

Як правило, специфічна діагностика алергії проводиться на основі збору даних сімейного та особистого анамнезу, за результатами шкірного тесту і провокаційних проб. Для підтвердження діагнозу і виявлення патогенетичних механізмів захворювання ключову роль відіграють лабораторні методи дослідження [8, 9].

Загальний імуноглобулін Е (ІgE) не вважається лабораторним маркером atopічних захворювань. Atopічний (ІgE-залежний) механізм може лежати в основі кропив'янки, деяких форм васкулітів тощо. Алергічні реакції на деякі лікарські засоби також розвиваються за ІgE-залежним механізмом. При всіх перерахованих вище станах синтез високих титрів специфічних антитіл класу ІgE може призводити до підвищення рівня загального ІgE в сироватці. Крім atopічних захворювань, загальний ІgE сироватки крові значно підвищується при паразитарних інвазіях та мікозах [9].

Проведення ефективних лікувально-профілактичних заходів у пацієнтів з алергічними захворюваннями має здійснюватися з урахуванням достовірної інформації про те, на які конкретно алергени відзначається сенсibilізація у хворого [10]. У випадку прояву алергічної реакції доцільно визначення алергічного агента, що став причиною реакції, шляхом виявлення специфічних антитіл класу ІgE в сироватці крові [5, 11, 12]. Цей підхід також можна використовувати для визначення безсимптомної сенсibilізації. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває достовірна специфічна діагностика

алергії з визначенням причинних алергенів у кожному конкретному випадку [5].

Очевидно, що для вирішення завдання специфічної лабораторної діагностики алергії необхідні адекватні in vitro методи для виявлення ІgE-антитіл до конкретних алергенів, серед яких найбільш поширеним є імуноферментний аналіз (ІФА). Разом з тим, в літературі [5, 13-16] описані різні модифікації ІФА для виявлення специфічних ІgE людини. Різні фірми-виробники також пропонують для використання в лабораторній службі імуноферментні діагностичні набори, засновані на різних варіантах ІФА.

Метою роботи була розробка та порівняльна характеристика різних модифікацій імуноферментного аналізу для визначення специфічних ІgE-антитіл.

Матеріали і методи. *Алергени (антигени).* У даній роботі використовували такі алергени. Рекомбінантний алерген пилку берези *Betula verrucosa* – профілін rBet v 2 (INDOOR Biotechnologies Inc., США), отриманий у *E. coli*, молекулярна маса 14 кДа, очищений афінною хроматографією на полі-L-проліні та іонообмінною хроматографією, чистота в електрофорезі у поліакриламідному гелі (ПААГ) з додецилсульфатом натрію (ДСН) – не менше 90% [17]. Рекомбінантний білок теплового шоку *Chlamydia trachomatis* rHSP-60 (ТОВ "Агробіомед", Росія), отриманий у *E. coli*, молекулярна маса 60 кДа, очищений імуноафінною хроматографією, чистота в електрофорезі в ПААГ з ДСН – не менше 90%.

Моноклональні антитіла до ІgE людини. Моноклональні антитіла (МКАТ) були раніше отримані за короткостроковою схемою імунізації (7-8 днів): антиген вводили в подушечки задніх лапок мишей у сумарній дозі 50 мкг ІgE на тварину, перші дві ін'єкції здійснювали з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США), а третю – без ад'юванта. Гібридизацію проводили з використанням лімфоцитів, отриманих з регіонарних лімфатичних вузлів мишей. Детально дані дослідження описані раніше [18,19]. У складі імуноферментного кон'югату використовували МКАТ 165C12 (ізотип ІgG1, титр в культуральній рідині 1:1000, константа афінності $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$), а для сорбції (антитіла "захоплення") використовували МКАТ 164H10 (ізотип ІgG1, титр в культуральній рідині 1:1000, константа афінності $2,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$).

Контрольна панель сироваток. Для розробки та порівняльної характеристики різних варіантів ІФА нами попередньо були сформовані контрольні панелі сироваток. Для оцінки ІФА для визначення ІgE-антитіл до профіліну Bet v 2 використовували 10 сироваток пацієнтів з полінозом (сезонний алергійний ринокон'юнктивіт), що виявляється в кінці квітня – початку травня (період

цвітіння берези та інших дерев), і рівнем загального IgE до 500 МО/мл. У якості позитивних зразків для характеристики ІФА для визначення IgE до білка теплового шоку *Ch. trachomatis* використовували 10 сироваток, позитивних на IgG-антитіла до HSP-60, а з вмістом загального IgE не менше 50 МО/мл. Панель негативних сироваток була отримана від 20 донорів, які не мають в анамнезі алергічних захворювань; кожен зразок був негативним на IgG-антитіла до HSP-60, а рівень загального IgE не перевищував 20 МО/мл. Контрольні зразки були атестовані за II Міжнародним стандартом WHO 75/502.

Біотинування білків. Біотинування антитіл та алергенів (антигенів) проводили за J. Goding [20]. До 0,9 мл розчину антитіл у концентрації 1 мг/мл, після діалізу протягом 12 годин проти 0,1 М карбонатно-бікарбонатного буфера pH 8,6, додавали 0,1 мл диметилсульфоксиду, що містить 0,1 мг N-гідроксисукцинімідного ефіру амінокапроїдбіотину. Після чотирьох годин інкубації в темноті при кімнатній температурі. Для зупинки реакції додавали 1 М розчин хлориду амонію (20 мкл на 1 мг антитіл) і діалізували проти фосфатно-сольового буферного розчину (ФСБ), що містить 0,1% азиду натрію, з метою видалення ефіру біотину, що не зв'язався, при +4 °C протягом 12-14 годин. Біотинування алергенів (антигенів) проводили за аналогічною схемою.

Отримання олігомерного кон'югату стрептавідин-пероксидаза проводили за базовою методикою [21] з модифікаціями [22]. 40 мг пероксидази хрому (лужна ізоформа) (Sigma, США) розчиняли в 2 мл води, додавали 200 мкл 0,25 М NaIO₄ та інкубували при кімнатній температурі 20 хв у темноті. До розчину додавали 1/3 об'єму сухого сефадексу G-15 та перемішували 10 хв у темноті при кімнатній температурі. Отриману суспензію центрифугували 5 хв зі швидкістю 4000 об/хв при кімнатній температурі. Супернатант відбирали, а осад сефадексу G-15 промивали 0,5 мл води і знову центрифугували. Супернатант об'єднували і діалізували проти 0,1 М боратного буфера (pH 9,4) 2 год при 4 °C. Для амінування пероксидази хрому (ПХ) до 1 мл окисленої пероксидази (концентрація приблизно 10 мг/мл) додавали етилендіамін до концентрації 25 мМ і аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували ніч проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, при 4 °C. Спектрофотометрично визначали концентрації амінованої й окисленої ПХ, змішували у співвідношенні 3:1, 1:1 і 1:3 за масою та інкубували 2 год при кімнатній температурі. Додавали стрептавідин, віддіалізований проти 0,1 М боратного буфера, pH 9,4, у співвідношенні пероксидаза : стрептавідин 2:1 – 10:1 за масою та інкубували 3 год при кімнатній температурі в темноті. Потім додавали аскорбат натрію до концентрації 2,5 мМ, інкубували 2 год при кімнатній температурі і діалізували проти ФСБ ніч при 4 °C. Кон'югат використовували без подальшого фракціонування.

Синтез пероксидазного кон'югату антитіл. Кон'югування МКАТ з ПХ проводили у ваговому співвідношенні антитіл до ферменту 2:1 методом періодатного окислення за P. Tijssen [21] з модифікаціями. Пероксидазу хрому (Sigma, США) розчиняли в 0,1 М бікарбонатному буфері (pH 8,3) до концентрації 15 мг/мл та додавали рівний об'єм водного розчину періодату натрію з концентрацією 14 мМ. Для окислення ПХ суміш інкубували 2 год при кімнатній температурі. Отриманий розчин окисленої ПХ змішували з розчином антитіл, попередньо віддіалізованих проти 0,1 М карбонатного буфера (pH 9,2). Суміш переносили в хроматографічну колонку й додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25,

інкубували 30 хв при кімнатній температурі. Розчин кон'югату елюювали з колонки і додавали 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл). Для зупинки реакції суміш залишали на 30 хв при кімнатній температурі, додавали ще 3/20 частини розчину NaBH₄, інкубували 60 хв. Отриманий розчин пероксидазного кон'югату МКАТ діалізом переводили в 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Синтез пероксидазних кон'югатів рекомбінантних білків-алергенів. Кон'югування рекомбінантних білків rBet v 2 і rHSP-60 з ПХ проводили шляхом N-гідроксисукцинімід ефір-малеїмід опосередкованим методом [23, 24]. Для цього використовували гетеробіфункціональний реагент – сульфо-сукциніміділ-4-(N-малеїмідометил)-циклогексан-1-карбоксилат (Sulfo-SMCC). Реакцію проводили за G. Hermanson [23] з невеликою модифікацією. З препаратів рекомбінантних білків rBet v 2 та rHSP-60 видаляли компоненти буфера за допомогою гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300. На першій стадії кон'югації проводили активацію пероксидази sulfo-SMCC, sulfo-SMCC, що не прореагував, та інші низькомолекулярні продукти видаляли шляхом гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300. На другій стадії кон'югації проводили реакцію maleїмідної групи, приєднаної до активованої ПХ, з сульфгідрильними групами рекомбінантних білків. Білок, що не прореагував, та інші низькомолекулярні продукти видаляли шляхом гель-фільтрації на колонці з сефакрилом S-300 (2,5 × 100 см). Отриманий розчин кон'югату білків-алергенів діалізом переводили у 0,02 М фосфатний буфер, що містить 0,15 М NaCl.

Твердофазний імуоферментний аналіз. Процедура конкретної модифікації аналізу була об'єктом розробки, разом з тим, ряд етапів аналізу був однаковим, а саме: для відмивання лунок планшетів використовували фосфатно-сольовий буфер з додаванням 0,05% твін-20 (ФСБТ), pH 7,2-7,4; між різними етапами аналізу планшет тричі відмивали ФСБТ і один раз деіонізованою водою; в якості субстрату використовували 0,003% розчин перекису водню в 0,15 М цитратному буфері, pH 5,0, а в якості хромогену – орто-фенілєндіамін; реакцію зупиняли 2 М сірчаною кислотою; оптичну густину при довжині хвилі 492 нм/630 нм вимірювали на спектрофотометрі.

Процес адсорбції антигенів оцінювали за інтенсивністю реакції з контрольними специфічними і негативними сироватками. Для кількісної оцінки аналізу використовували індекс позитивності (ІП) – відношення середньої оптичної густини (ОГ) позитивних контрольних зразків до граничного значення (ГЗ) оптичної густини; ГЗ розраховували як суму середнього арифметичного ОГ негативних зразків і трьох середньоквадратичних відхилень значень ОГ негативних зразків.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Дослідження проводили із дотриманням міжнародних та національних біоетичних рекомендацій.

Результати та їх обговорення. Теоретична характеристика різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл. Перший *in vitro* тест для визначення специфічних до алергенів імуноглобулінів класу E – радіоаллергосорбентний тест (РАСТ) – був запропонований в 1967 році [25]. Деякий час по тому з'явилися аналоги РАСТ на основі імуоферментного аналізу. Однак чутливість цих методів була обмежена низькою сорбційною здатністю твердої фази (використовувалися, як правило, прості целюлозні диски). Процедура інкубації кожної стадії займала від 3-х до 18-ти годин, автоматизація була мало ймовірна, застосовувався напівкількісний спосіб оцінки результатів (у

класах), та й утилізація радіоактивних відходів була проблематичною [26].

У 1990-і роки були розроблені тест-системи другого покоління, які широко використовуються в практиці до цього часу, для напівавтоматизованого кількісного визначення специфічних IgE. У таких тест-системах застосовуються різноманітні технології детекції, різні носії, екстракти алергенів і типи антитіл. Використання наборів від різних фірм-виробників з різними характеристиками призвели до отримання суперечливих результатів аналізів, що в свою чергу викликало низку запитань та невдоволення практичних лікарів. Тому однією з основних методичних проблем визначення IgE-антитіл є питання відповідності результатів лабораторного тестування з клінічною симптоматикою і алергологічним анамнезом [26, 27].

Тест-системи другого покоління за технологічними параметрами можна поділити на ті, в яких алерген іммобілізований на твердій фазі [13, 16], і системи в яких алерген знаходиться в рідкій фазі [14, 15]. При викорис-

танні твердофазних алергенів складність представляє тип твердої фази, що забезпечує максимальну сорбційну ємність і доступність алергену для молекул IgE. Крім того, можливо припустити, що при сорбції алергену на тверду фазу можуть відбуватися його конформаційні зміни, що, у свою чергу, може негативно позначатися на специфічності подальшої реакції "антиген-антитіло". Отже системи з рідкими алергенами мають незаперечну перевагу. На рис. 1 наведені описані в літературі модифікації ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл. У рамках поставленого завдання нами була проведена розробка та порівняльна характеристика чотирьох модифікацій ІФА для виявлення IgE людини до алергену пилку берези – профіліну Bet v 2, який опосередковує алергічні реакції і перехресну реактивність між неспорідненими рослинами [28, 29], і білку теплового шоку *Ch. trachomatis* (heat shock protein 60, HSP-60), який будучи консервативним внутрішньоклітинним білком опосередковує перехресну реактивність між філогенетично віддаленими видами [30, 31].

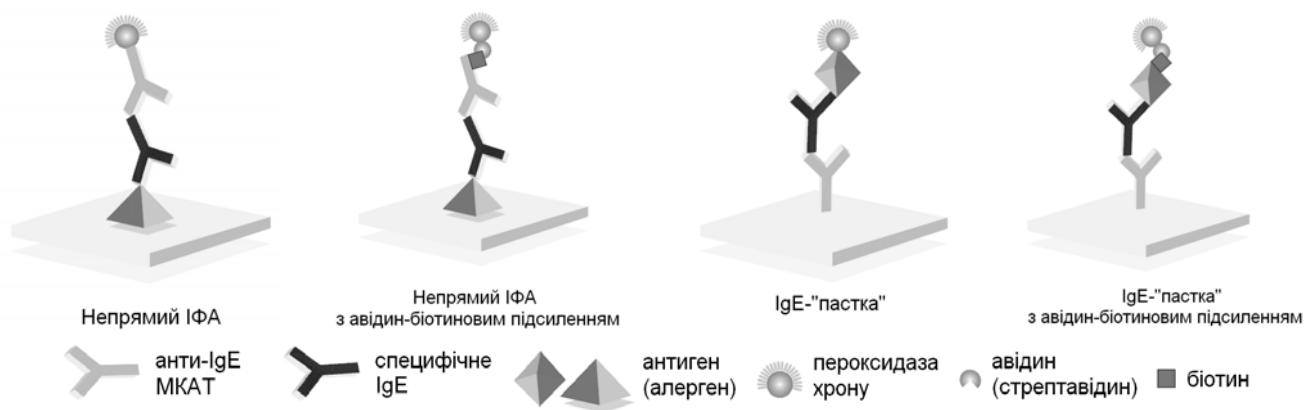


Рис. 1. Модифікації ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл

Розробка та характеристика непрямого ІФА. Оскільки чутливість ІФА залежить від цілого ряду фізико-хімічних факторів (температура, йонна сила і рН реакційного середовища, концентраційні співвідношення компонентів і тривалість їх взаємодії), при конструюванні тест-систем використовували емпіричний підбір оптимальних параметрів постановки тесту.

Конструювання імуноферментного набору включало пошук оптимальних параметрів тест-системи, від яких залежать чутливість і специфічність проведеної реакції. Важливими чинниками у розробці тест-системи були вибір типу твердої фази, а також визначення умов адсорбції на твердій фазі, тобто встановлення оптимальної концентрації антигену, складу сенсibilізуючого буфера, умов відмивання не зв'язаних компонентів, часу і температури зв'язування імуноглобулінів з поверхнею лунок полістиролових планшетів, робочої дози імуноферментного кон'югату. Для розробки використовували полістиролові 96-лунокві планшети серії Nunc виробництва Thermo Scientific, США. Для конструювання непрямого ІФА нами був обраний планшет типу MaxiSorp, призначений для сорбції гідрофільних білків-антигенів з невисокою молекулярною масою; даний вид планшета характеризується високою сорбуючою здатністю (600-650 нг IgG/см²).

Для підбору оптимальних умов сорбції оцінювали інтенсивність імуноферментної реакції при різних концентраціях антигену в розчині. Нестача антигенів призводить до зниження чутливості тесту, а надлишок до перевитрати дорогого реагенту. На достовірність результатів ІФА впливає неспецифічне зв'язування реагентів з вільними сайтами полістиролових планшетів. У

наших експериментах ми досліджували різні кількості антигенів в інтервалі 1 ÷ 20 мкг/мл. Найбільш оптимальний рівень насичення поверхні планшетів досягався при концентрації профіліну rBet v 2 рівної 10 мкг/мл і концентрації білка rHSP-60 рівною 5 мкг/мл, при цьому з сироватками негативної панелі антигени реагували негативно. Разом з тим, значення індексу позитивності для сироваток позитивної панелі були досить низькі, а саме: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП складало 1,52 (ІП_{мін} = 0,94, ІП_{макс} = 1,74), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП складало 1,12 (ІП_{мін} = 0,82, ІП_{макс} = 1,25) (рис. 2). Отримані дані свідчили про недоцільність подальшої оптимізації умов проведення аналізу через його вкрай низьку вихідну інформативність (чутливість і специфічність). Причиною отриманих результатів, швидше за все, є конкуренція за сорбований на твердій фазі антиген між антитілами різних класів. Враховуючи той факт, що абсолютна концентрація IgE антитіл навіть у сироватках людей з алергічними захворюваннями на 2-3 порядки нижче вмісту антитіл класу IgG, непрямий ІФА не забезпечує належного рівня виявлення специфічних антитіл. Можливо припустити, що використання даної модифікації ІФА буде більш ефективним за участю авідин-біотинового підсилення (АБП) сигналу аналізу.

Розробка та характеристика непрямого ІФА з авідин-біотиновим підсиленням. Конструювання імуноферментного набору проводили на основі результатів попередніх експериментів з розробки непрямого ІФА. З метою зниження неспецифічної взаємодії на етапі інкубації досліджуваних зразків ми знизили температу-

ру інкубування до 20-25 °C (кімнатна температура) і збільшили тривалість до 2 ч. На наступному етапі, нами були оптимізовані умови реакції біотинінування анти-IgE-антитіл з IgE-антитілами позитивних сироваток. Найкращі результати були отримані при використанні фосфатно-сольового буферного розчину з 0,05% твіну-20, рН 7,2-7,4, з додаванням негативної сироватки людини (20%) і казеїну (100 мг/мл) (табл. 1). Аналогічний буферний розчин був використаний і для інкубації кон'югату стрептавідин-пероксидаза. Розроблений ІФА забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі. Значення ІП для сироваток позитивної панелі було дещо вище, ніж у випадку ІФА без АБП: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 1,71 (ІП_{min} = 1,05, ІП_{max} = 1,97), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 1,24 (ІП_{min} = 0,98, ІП_{max} = 1,48) (рис. 2).

Розробка та характеристика ІФА модифікації IgE-"пастка". Даний варіант ІФА передбачає фіксацію на твердій фазі IgE людини із сироватки незалежно від їх специфічності. З цією метою МКAT 164Н10 проти IgE людини [18] в 0,05 М карбонат-бікарбонатному буферному розчині (КБР), рН 9,6, протягом 12 год при 4 °C сорбували на поверхні полістиролових планшетів Nunc MediSorp (згідно з паспортними даними планшети призначені для сорбції гідрофільних білків, зокрема імунно-

глобулінів, характеризуються сорбційною здатністю в діапазоні 500-600 нг IgG/см² і забезпечують низьку неспецифічну активність при тестуванні сироваток та плазми крові людини). Концентрація анти-IgE МКAT була обрана на підставі попередньої серії експериментів [19] і становила 2 мкг/мл. Подальші умови проведення аналізу були вибрані на підставі результатів попередніх етапів дослідження (наведено в табл. 2). Розроблений ІФА IgE-"пастка" забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі, а значення ІП для сироваток позитивної панелі було відчутно вище, ніж у випадку непрямих варіантів ІФА. Так при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 3,22 (ІП_{min} = 1,66, ІП_{max} = 4,21), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 2,45 (ІП_{min} = 1,44, ІП_{max} = 2,96) (рис. 2).

Для даної модифікації ІФА було проведено визначення чутливості аналізу: зразки IgE людини із концентрацією 0; 0,1; 0,5; 1; 5 МО/мл (атестовані за II Міжнародним стандартом WHO 75/502) інкубували у лунках планшети із іммобілізованими анти-IgE МКAT, а утворений комплекс виявляли за допомогою кон'югату анти-IgE-ПХ. Границя чутливості аналізу для виявлення специфічних до профіліну Bet v 2 та білку теплового шоку *Ch. trachomatis* IgE-антитіл не перевищувала 0,5 МО/мл.

Таблиця 1. Оптимізація параметрів інкубації біотинільованих реагентів у непрямому ІФА з авідин-біотиновим підсиленням сигналу

Склад розчину для розведення кон'югату	К+середнє	К-середнє	ГЗ
ФСБТ, рН 7,2-7,4	0,982±0,320	0,364±0,084	0,371
ФСБТ + негативна сироватка (20%), рН 7,2-7,4	0,975±0,358	0,295±0,077	0,304
ФСБТ + негативна сироватка (20%) + казеїн (100 мг/мл), рН 7,2-7,4	1,002±0,298	0,224±0,070	0,232

Розробка та характеристика ІФА модифікації IgE-"пастка" з авідин-біотиновим підсиленням сигналу. Конструювання імуноферментного набору проводили на основі результатів попередніх експериментів з розробки непрямого ІФА з АБП, а також ІФА модифікації IgE-"пастка". Умови підготовки та проведення аналізу представлені в табл. 2. Розроблений ІФА IgE-"пастка" з АБП забезпечував негативний результат при тестуванні всіх сироваток негативною панелі, а значення ІП для сироваток позитивної панелі було вище, ніж в аналогічному варіанті ІФА, але без авідин-біотинового підсилення: при виявленні IgE антитіл до Bet v 2 середнє значення ІП склало 3,89 (ІП_{min} = 1,79, ІП_{max} = 5,02), а при виявленні IgE антитіл до HSP-60 середнє значення ІП склало 2,92 (ІП_{min} = 1,98, ІП_{max} = 3,56) (рис. 2). Для даної модифікації ІФА також було проведено визначення чутливості аналізу: зразки IgE людини із концентрацією 0; 0,1; 0,5; 1; 5 МО/мл інкубували у лунках планшети із іммобілізованими анти-IgE МКAT, а утворений комплекс виявляли за допомогою біотинільованих анти-IgE МКAT. Границя чутливості даного варіанту ІФА склала 0,1 МО/мл.

Порівняльна характеристика різних модифікацій ІФА. Результати робіт з розробки та характеристики різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до профіліну пилку берези Bet v 2 і білку теплового шоку *Ch. trachomatis* HSP-60 представлені в табл. 2 і на рис. 2. Отримані дані свідчать про непридатність непрямого варіанту ІФА, навіть з використанням системи авідин-біотинового підсилення сигналу, для виявлення специфічних IgE-антитіл до алергенів як рослинного, так й інфекційного походження. У даних дослідженнях, навіть при оптимізації умов аналізу, були отримані негативні результати при тестуванні ряду сироваток позитивної панелі; при тестуванні нега-

тивних зразків були зафіксовані значні "фонові" сигнали (високі значення граничного значення, рис. 2). Головною причиною незадовільних характеристик інформативності непрямого варіанту ІФА, на нашу думку, є недостатній рівень фіксації специфічних IgE-антитіл на твердій фазі через концентраційної конкуренції зі специфічними антитілами інших класів, перш за все IgG, присутніх у сироватках крові. Використання IgE-захоплення для виявлення специфічних IgE-антитіл забезпечувала задовільні показники інформативності ІФА: не було зафіксовано хибнонегативних результатів при тестуванні сироваток позитивної панелі, "фонові" сигнали були значно нижче, ніж у випадку непрямих варіантів аналізу, рівень граничного значення (cut off) був нижче в 4-7 разів. Індеси позитивності для варіантів ІФА IgE-захоплення були достовірно значно вищими у порівнянні із аналогічними показниками для непрямого ІФА (рис. 2), а саме: при виявленні специфічних IgE-антитіл до Bet v 2 ІП для варіантів IgE-захоплення був у 2,12 та 2,27 разів вище (з і без використання системи АБП, відповідно); при дослідженні антитіл класу IgE до HSP-60 *Ch. trachomatis* ІП для варіантів IgE-"пастки" також більш ніж удвічі відрізнялися від таких же показників непрямого ІФА – були у 2,19 та 2,35 разів вище (з і без використання системи АБП, відповідно).

Проведені дослідження щодо встановлення границі чутливості аналізу модифікацій на основі IgE-"пастки" засвідчили, що даний показник знаходиться у діапазоні 0,1÷0,5 МО/мл, що, у свою чергу, є цілком зіставним (має такий самий порядок) із аналогічним показником різних комерційних діагностичних наборів, зокрема "СПЕЦ-IgE-ИФА" (Хема, Росія) та "CARLA-SYSTEM" (RADIM diagnostics, Італія) [32]. Слід зазначити, що обидва досліджених варіанту IgE-захоплення (з і без авідин-біотинового підсилення сигналу) можна визнати

еквівалентно придатними для виявлення специфічних антитіл класу IgE.

Для розробки готових діагностичних наборів та їх серійного випуску важливим є доступність сировини для виготовлення позитивних контрольних зразків, технологічність і простота їх отримання та стандартизації.

Для всіх вивчених варіантів ІФА в якості позитивного стандарту повинні використовуватися людські антитіла до конкретного антигену (алергену). Очевидно, формування пулу сироваток (плазми) людини для наступних виділення і очищення специфічних IgE в промислових масштабах є вкрай складним завданням.

Таблиця 2. Умови підготовки та проведення різних модифікацій ІФА

Характеристика	Модифікації ІФА			
	Непрямий	Непрямий з АБП	IgE-"пастка"	IgE-"пастка" з АБП
Тверда фаза	Nunc MaxiSorp	Nunc MaxiSorp	Nunc MediSorp	Nunc MediSorp
Імобілізуючий розчин	ФСБ, pH 7,2-7,4	ФСБ, pH 7,2-7,4	КБР, pH 9,6	КБР, pH 9,6
Біокомпонент імуносорбенту	rBet v 2 / rHSP-60	rBet v 2 / rHSP-60	анти-IgE МкАт	анти-IgE МкАт
Концентрація білка для сорбції, мкг/мл	10 / 5	10 / 5	2	2
Умови сорбції	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C	12 год, 4 °C
Тривалість і температура інкубації зразків	1 год, 37 °C	2 год, 20-25 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C
Розчин для інкубації біотинільованих реагентів	–	ФСБТ + сироватка + казеїн, pH 7,2-7,4	–	ФСБТ + сироватка + казеїн, pH 7,2-7,4
Умови інкубації біотинільованих реагентів	–	1 год, 37 °C	–	1 год, 37 °C
Імуноферментний кон'югат	анти-IgE МкАт + ПХ	Стрептавідин + ПХ	rBet v 2 / rHSP-60 + ПХ	Стрептавідин + ПХ
Умови інкубації імуноферментного кон'югату	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C	1 год, 37 °C

Примітка: вказані умови проведення аналізу для виявлення IgE антитіл до Bet v 2 / HSP-60.

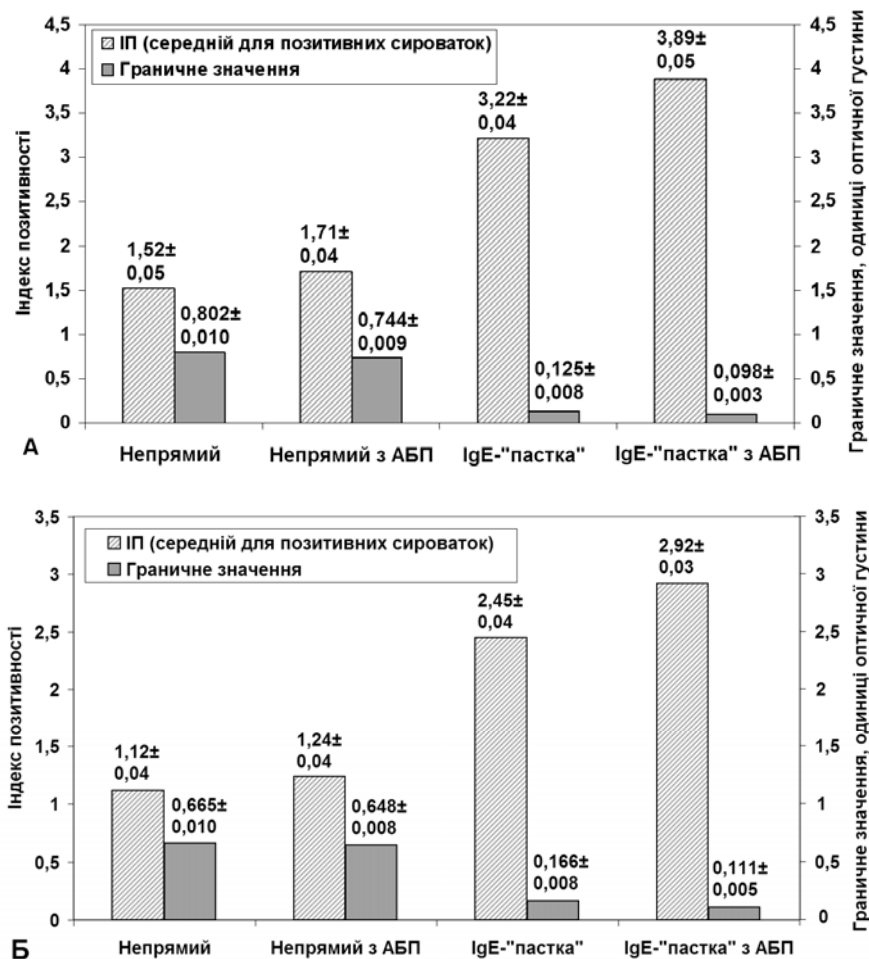


Рис. 2. Порівняльна характеристика аналітичних характеристик різних модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до профіліну пилку берези Bet v 2 (А) та HSP-60 *Ch. trachomatis* (Б) (представлені середні значення показників аналізу за результатами тестування контрольних панелей сироваток у 4-х повторях, $p < 0,05$)

Висновки. Проведена розробка двох базових модифікацій ІФА для виявлення специфічних антитіл класу IgE до алергену рослинного (профілін пилку берези Bet v 2)

та інфекційного (білок теплового шоку *Chlamydia trachomatis* HSP-60) походження: непрямого варіанту й IgE-"пастки" (з і без використання системи авідин-

біотинового підсилення сигналу). На підставі порівняльної характеристики даних модифікацій за показниками інформативності аналізу непрямий ІФА не є перспективним для визначення специфічних ІgЕ-антитіл у сироватках (плазмі) крові людини. Модифікація ІФА ІgЕ-"пастка" забезпечує задовільні аналітичні характеристики як з, так і без авідин-біотинового підсилення сигналу. Перспективним видається створення гібридних позитивних контрольних зразків для використання в діагностичних тест-системах з метою виявлення специфічних антитіл класу ІgЕ до алергенів різного походження.

Список використаних джерел

1. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. Краткое издание. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 640 с.
2. Bochner B.S., Rothenberg M.E., Boyce J.A. et al. // Advances in mechanisms of allergy and clinical immunology in 2012 // J. Allergy Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 131, 3. – P. 661-667.
3. Burks A.W., Calderon M.A., Casale T. et al. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report // J. Allergy Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 131, 5. – P. 1288-1296.
4. Лусс Л.В. Этиология, патогенез, проблемы диагностики и лечения аллергического ринита // Рус. мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 12. – С. 718-729.
5. Прилуцкий А.С., Кайдашев И.П., Проценко Т.В. и др. Определение специфического ІgЕ к различным алергенам // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. – 2011. – № 2. – С. 80-82.
6. Ройт А., Бростовф Дж., Мейл Д. Иммунология. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
7. Якобияк М. Імунологія / Переклад з польської за ред. проф. В.В.Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.
8. Казмирчук В.Є., Ковальчук Л.В. Клінічна імунологія і алергологія. – Вінниця: Нова книга, 2006. – 526 с.
9. Митин Ю.А. Лабораторная диагностика аллергических заболеваний: Методические рекомендации. – СПб: Светлица, 2010. – 144 с.
10. Garcia-Ara M.C., Boyano-Martinez M.T., Diaz-Pena J.M. et al. Cow's milk-specific immunoglobulin E levels as predictors of clinical reactivity in the follow-up of the cow's milk allergy infants // Clin Exp Allergy. – 2004. – Vol. 34. – P. 866-870.
11. Bindels J.G., Hoijer M. Allergens: latest developments, newest techniques // Bull Int Dairy Fed. – 2000. – Vol. 351. – P. 31-32.
12. Sampson H.A. Food allergy // J. Allergy Clin. Immunol. – 2003. – Vol. 111, 2. – P. 540-547.
13. Kurup V.P., Sussman G.L., Yeang H.Y. et al. Specific IgE response to purified and recombinant allergens in latex allergy // Clinical and Molecular Allergy. – 2005. – Vol. 3. – P. 11-20.
14. Santos A.B.R., Rocha G.M., Oliver C. et al. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from Ascaris lumbricoides and cockroach // J Allergy Clin Immunol. – 2008. – Vol. 121, 4. – P. 1040-1046.
15. Ye Y.-M., Hur G.-Y., Park H.-J. et al. Association of specific IgE to Staphylococcal superantigens with the phenotype of chronic urticaria // J. Korean Med. Sci. – 2008. – Vol. 23. – P. 845-851.
16. Патент РФ 2436100, МПК (2006.01) G01N33/53, A61P37/08. Способ определения специфических ІgЕ-антител к стафилококку в сыворотке крови больного аллергическими заболеваниями, имеющего

гиперчувствительность к аллергенам стафилококка, с применением тест-системы для определения специфических ІgЕ-антител к стафилококку, выделенная из стафилококка активная аллергенная субстанция (ААС) и способ диагностики стафилококковой аллергии / Федосеева В.Н., Камышева В.А., Миславский О.В. и др.; ФГБУ "Государственный научный центр "Институт иммунологии" ФМБА России, Федосеева В.Н., Мартынов А.И., Камышева В.А. – № 2010111254/15; Заявл. 25.03.2010; Опул. 20.09.2010.

17. Susani M., Jertschin P., Dolecek C. et al. High level expression of birch pollen profilin (Bet v 2) in Escherichia coli: purification and characterization of the recombinant allergen // Biochem Biophys Res Commun. – 1995. – Vol. 215. – P. 250-263.
18. Галкин О.Ю., Савченко А.А., Нікітіна К.І. та ін. Одержання та дослідження властивостей нових моноклональних антитіл до ІgЕ людини // Український біохімічний журнал. – Т. 85, № 5. – 2013. – С. 81-85.
19. Galkin A.Yu., Dugan A.M. Elaboration of immunoenzymatic test-kit for total human IgE assay and investigation of its analytical properties // International Journal of Immunology. – 2013. – Vol. 1, No. 1. – P. 1-6.
20. Goding J. Monoclonal antibodies. Principles and practice. – San Diego: Academic press, 1996. – 492 p.
21. Tijssen P. // Lab. Techniques in Biochem. and Molecular Biology. – 1985. – Vol. 15. – P. 674.
22. Павлова І.С., Любавина І.А., Жердев А.В. и др. Простые иммунохимические методы определения пестицидов на основе биотин-стрептавидиновой системы // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 2. – № 10. – С. 832-833.
23. Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. – San Diego: Academic Press, 2000. – 760 p.
24. Galkin O.Yu. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of their use for diagnostics of infectious diseases // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2010. – Т. 5, № 4. – С. 54-60.
25. Wide L., Bennich H., Johansson S.G. Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies. – Lancet. – 1967. – Vol. 2. – P. 1105-1107.
26. Bernstein I., Li J., Bernstein D. et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter // Ann All Asthma Immunol. – 2008. – Vol. 100. – P. 1-148.
27. Cox L., Williams P.B., Sicherer S. et al. Pearls and pitfalls of allergy diagnostic testing: report from the American College of Allergy, Asthma and Immunology/ American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Specific IgE Test Task Force // Ann. All. Asthma. Immunol. – 2008. – Vol. 101. – P. 580-592.
28. Valenta R., Duchene M., Ebner C. et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens // J. Exp. Med. – 1992. – Vol. 175. – P. 377-385.
29. Villalta D., Asero R. Sensitization to the pollen pan-allergen profilin. Is the detection of immunoglobulin E to multiple homologous proteins from different sources clinically useful? // J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 20 (7). – P. 591-595.
30. Flückiger S., Limacher A., Glaser A.G. et al. Structural aspects of cross-reactive allergens // Recent Res. Devel. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 5. – P. 57-75.
31. Patel K.K., Anderson E., Salva P.S. et al. The prevalence and identity of Chlamydia-specific IgE in children with asthma and other chronic respiratory symptoms // Respiratory Research. – 2012. – Vol. 13. – P. 32-42.
32. Liccardi G., Dente B., Triggiani M. et al. A multicenter evaluation of the CARLA system for the measurement of specific IgE antibodies vs. other different methods and skin prick tests // J. Invest. Allergol. Clin. Immunol. – 2002. – Vol. 12 (4). – P. 235-241.

Надійшла до редколегії 16.09.13

А. Галкин, канд. биол. наук, М. Михальчук, студ.
Национальный технический университет Украины "Киевский политехнический институт", Киев,
В. Казмирчук, д-р мед. наук
Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев,
Ю. Гурженко, д-р мед. наук
Институт урологии НАМН Украины, Киев

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ІgЕ-АНТИТЕЛ

Разработка и сравнительное исследование различных модификаций иммуноферментного анализа (ИФА) для определения специфических ІgЕ-антител. Биохимический синтез конъюгатов антител и антигенов, ИФА. Проведено теоретическое обоснование целесообразности использования ИФА для выявления специфических ІgЕ-антител; осуществлено научную разработку и сравнительную характеристику двух модификаций ИФА для выявления специфических иммуноглобулинов класса ІgЕ к профилину пыльцы березы Bet v 2 и белка теплового шока Chlamydia trachomatis HSP-60: непрямого варианта и ІgЕ-"захвата" (с и без использования системы авидин-биотинового усиления сигнала). Доказано, что по показателям информативности анализа (специфичность, чувствительность, воспроизводимость) непрямого ИФА не обеспечивает эффективное определение специфических ІgЕ-антител; показано, что модификация ИФА ІgЕ-"захват" характеризуется удовлетворительными аналитическими показателями анализа как с, так и без авидин-биотинового усиления сигнала.

Ключевые слова: ІgЕ, антитела, иммуноферментный анализ, алергены.

O. Galkin, PhD., M. Myhalchuk, B.Sc.
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv,
V. Kazmirchuk, Dr.Med.Sc.
O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv,
Gurzhenko Yu., Dr.Med.Sc.
Institute of Urology of NAMS of Ukraine, Kyiv

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF DIFFERENT VERSIONS OF ELISA FOR DETECTION OF SPECIFIC IgE-ANTIBODIES

Development and comparative study of different modifications of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of specific IgE-antibodies. Biochemical synthesis of conjugates of antibodies and antigens, ELISA. Results: theoretical rationale for the use of ELISA for the detection of specific IgE-antibodies has been done; development and comparative characteristics of two ELISA modifications for the detection of specific IgE to birch pollen profilin (Bet v 2) and heat shock protein of Chlamydia trachomatis (HSP-60): indirect and IgE-"capture" variants (with and without use of avidin-biotin signal amplification) has been implemented. It is proved that in terms of analysis informative indicators (specificity, sensitivity, reproducibility) indirect ELISA does not provide effective determination of specific IgE-antibodies; it is shown that IgE-"capture" ELISA is characterized by satisfactory analytical performance analysis as with or without avidin-biotin amplification.

Keywords: IgE, antibodies, ELISA, allergens

УДК 578.2

С. Демідов, д-р біол. наук, проф., С. Дерев'янка, канд. біол. наук, ст. наук. співроб.,
Т. Бова, канд. біол. наук, М. Гончар, зав. лаб. ПЛР
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТЕШОВІРУСІВ СВИНЕЙ

*За результатами вірусологічних, генетичних та серологічних досліджень штами ентеровірусів свиней Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені на території України, рекласифіковано у відповідності до вимог Міжнародного комітету з таксономії вірусів і віднесено до роду *Teschovirus* виду *Porcine teschovirus*. Встановлено високу видову специфічність оригінальних олігонуклеотидних праймерів для ідентифікації тешовірусів свиней, що відкриває перспективи розробки діагностичних тест-систем на основі молекулярно-генетичних методів.*

Ключові слова: тешовіруси свиней, рекласифікація, праймери, полімеразна ланцюгова реакція.

Вступ. Тешовіруси свиней є етіологічними агентами ряду інфекційних хвороб, які завдають значних економічних збитків свинарській галузі. Однією з найнебезпечніших є ензоотичний енцефаломієліт (хвороба Тешена) свиней. Це контагіозне вірусне захворювання, яке супроводжується негнійним запаленням мозку та його оболонок, паралічами і парезами. Серед інфекційних хвороб свиней вірусної етіології, що реєструються в Україні, частка хвороби Тешена становить 24 % [2].

Збудником хвороби Тешена є вірус 1-го серотипу, який згідно сучасної міжнародної класифікації належить до родини *Picornaviridae*, роду *Teschovirus*, виду *Porcine teschovirus* [14].

Найчутливіші до тешовірусів є поросята у 2-6 – місячному віці, рідше свині 7-10 – місячного віку. Клінічні ознаки хвороби у тварин старшого віку реєструються в поодиноких випадках. Залежно від тривалості епізоотичного процесу захворюваність свиней нервовою формою становить 14 – 90 %, а летальність – від 75 до 90 % [6, 8].

Ефективність боротьби з хворобою Тешена, насамперед, залежить від своєчасного проведення протиензоотичних заходів і, зокрема, постановки діагнозу. Діагноз ставиться на основі клініко-епізоотологічного обстеження свинопоголів'я, результатів патолого-анатомічних та лабораторних досліджень. Лабораторна діагностика включає ізоляцію вірусу в культурі клітин з наступним типуванням його в реакції нейтралізації вірусу (РН) або імунофлюоресценції та виявлення вірусспецифічних антитіл у сироватках крові тварин. Для цього в Інституті сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН розроблено набір діагностиків ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней в реакції нейтралізації вірусу [6]. Цей метод і на сьогоднішній день є еталоном і основним тестом, однак він довготривалий, трудомісткий, потребує використання культури клітин, дорогих живильних середовищ. Крім того, постійно існує небезпека контамінації культури клітин мікрофлорою. У результаті тривалість постановки діагнозу збільшується з 10-ти до 30 діб.

Останні досягнення молекулярної біології відкривають перспективи розробки діагностичних засобів для ідентифікації вірусів на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В 1999 р. на основі вивчення структури геному Міжнародний комітет з таксономії вірусів [9-12] рекласифікував ентеровіруси свиней. За рішенням комітету ентеровіруси свиней, які відносились до родини *Picornaviridae* і роду *Enterovirus*, рекласифіковані в межах цієї ж родини в два окремих роди: *Teschovirus* з видом *Porcine teschovirus* (PTV) і власне під *Enterovirus* з видами *Porcine enterovirus A* та *Porcine enterovirus B* (PEV) (табл. 1.). До виду *Porcine teschovirus* віднесено 11 серотипів вірусів, до виду *Porcine enterovirus A* – один серотип, виду *Porcine enterovirus B* – два серотипи [3]. У 2009 році Міжнародний комітет з таксономії вірусів рекласифікував вид *Porcine enterovirus A* в окремий рід *Sapelovirus* вид *Porcine sapelovirus* (PSV) [15].

У зв'язку з рекласифікацією ентеровірусів свиней виникає необхідність у розробці нових високо специфічних методів ідентифікації вірусів, визначення таксономічного положення раніше виділених в Україні епізоотичних, референтних та виробничих штамів ентеровірусів свиней у відповідності до положень Міжнародного комітету з таксономії вірусів.

Метою нашої роботи було дослідження РНК вірусів в полімеразній ланцюговій реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ) за використання нових штучно синтезованих, оригінальних, олігонуклеотидних праймерів та проведення генетичної рекласифікації штамів ентеровірусів свиней, виділених на території України.

Матеріали і методи. В досліді використано штами ентеровірусів свиней (згідно тривіальної класифікації Романенка В.П. [7]) Ч-2372, Б-652, П-642, Д-32, Д-33, Д-34, І-59, Р-501, Г-95, П-142, В-151, та Г-31, виділені від свиней співробітниками лабораторії вірусології і зберігаються в колекції штамів вірусів Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.