

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В ГИДРОЗОЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ИММУНОДИАГНОСТИКИ

А.Г. МЕШАНДИН*, В.С. БОЛДЫРЕВ

Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана

Представлены результаты применения антигенов *M. tuberculosis* в сочетании с коллоидными твёрдыми фазами в синтезе гидрозольных препаратов для экспрессной иммунодиагностики. Метод может быть использован для проведения анализов в медицинской и сельскохозяйственной отраслях и обеспечивать экспресс-диагностику в пределах 0,5–3,0 минут.

Ключевые слова: антигены, антитела, экспрессный гидрозольный иммуноанализ.

Введение

При развитии патологического состояния в организме человека либо животных в их биологических жидкостях: крови, моче, слюне — появляются определенные маркеры: специфические вещества сложной, в том числе белковой природы. При обнаружении тех или иных маркеров врач, либо ветеринарный врач может судить о факте заболевания. В ряде случаев это удается тогда, когда больной не подозревает о начале и развитии болезни. Следовательно, необходимо внедрять в практическую деятельность клиники новые экспрессные методы ранней диагностики. В распоряжении любого врача-клинициста должны быть диагностические препараты, позволяющие осуществить хотя бы качественную диагностику (по принципу «да-нет») с последующим более полным исследованием в случае «да» конкретной патологии, соответствующей его специальности.

Эти препараты должны быть дешевы, экспрессны — постановка реакции и считывание результатов не более 1–2 минут, не требовать дополнительных приборов (возможность проводить реакции непосредственно на рабочем месте, либо у постели больного, в карете скорой помощи, в полевых условиях), возможность ставить реакции с малыми объемами препарата и биоматериала, взятого у больного (10–20 мкл). Кроме того, они должны иметь стабильные и воспроизводимые

иммунохимические свойства, то есть выявлять маркеры того или иного заболевания в самом широком спектре биологических жидкостей (моче, слюне, сыворотке крови и т.д.) в минимальных концентрациях. В настоящее время иммунохимические методы далеки от сформулированных выше требований. Для большинства из них характерны отсутствие экспрессности, высокая стоимость одного анализа, требуются дорогостоящие приборы.

Представляемые в настоящем исследовании гидрозольные препараты являются коллоидными растворами частиц неорганической природы, на поверхности которых по определенной технологии адсорбированы биоспецифические лиганды (антигены, антитела). При последующем смешении с жидкостью в подлежащих тестированию биоматериалах (сыворотка крови, слюна, объекты смыва из окружающей среды и т.д.) в случае положительной реакции происходит агглютинация, видимая невооруженным глазом. Такая процедура позволяет проводить анализы медицинского, сельскохозяйственного, экологического и биотехнологического профиля практически без каких-либо приборов, в условиях самой простой лаборатории, полевых условиях и т.д., причем время постановки анализа составляет от 30 секунд до 2–3 минут.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись гидрозольные реагенты, используемые в реакции гидрозольной агглютинации (РГЗА).

Для исследования нами были изготовлены гидрозоли, нагруженные нативными и генно-инженерными антигенами с целью выявления антител в сыворотке крови, состав которых был следующим:

© 2017 г. Мешандин А.Г., Болдырев В.С.

* Автор для переписки:

Мешандин Алексей Гаврилович

доктор технических наук,

профессор кафедры химии МГТУ им. Н.Э. Баумана

E-mail: agim51@yandex.ru

I. Твердофазные носители (табл. 1):

Таблица 1

Твердофазные носители в качестве основы для гидрозольных диагностикумов

№	Тип носителя, формула	Плотность, г/см ³	Размер частиц, нм	Цвет
1.	Гексацианферрат (II) железа (III) или берлинская лазурь $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$	1,92	80–200	Синий
2.	Оксид железа Fe_3O_4	4,73	200–500	Коричневый

II. Модификатор для твердой фазы гидрозольных диагностикумов $HgCl_2$.

III. Биолиганды (табл. 2):

Таблица 2

Биолиганды, используемые в РГЗА

№	Тип биолиганда	Область применения
1.	Рекомбинантные антигены туберкулеза, полученные с помощью генно-инженерных технологий (BL(DT3)/pCFP-ESAT), Покровский завод биопрепаратов, Владимирская область	Для диагностики туберкулеза <i>in vivo</i>
2.	Комплексный туберкулезный антиген — диагностикум ППД производства Санкт-Петербургского НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова	Для диагностики туберкулеза <i>in vivo</i>

Методика изготовления гидрозолей для исследования состояла из нескольких этапов. Сначала выполняли синтез твердых фаз: $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ и Fe_3O_4 . Далее твердые фазы модифицировали 2% $HgCl_2$, после чего осуществляли хемосорбцию исследуемых биолигандов.

Объекты исследований. Для исследования в качестве биологических материалов использовали сыворотки крови больных людей с верифицированным диагнозом «Туберкулез» и сыворотки крови здоровых доноров.

Принцип реакции гидрозолевой агглютинации заключался в следующем: протекающая на молекулярном уровне реакция взаимодействия антигена с антителом должна приводить к развитию явлений, доступных наблюдению невооруженным глазом. Эту задачу удается решить, опираясь на факты множественности антигенных детерминант, а также на наличие двух областей связывания антигена у каждой молекулы антитела. Если коллоидные частицы нагрузить антигенами, то в силу бивалентности

комплементарных антител происходит их связывание или агглютинация. Образование даже небольших агрегатов приводит к их быстрому и хорошо заметному осаждению из коллоидного раствора с потерей последним агрегативной устойчивости. При смешивании разбавленных сывороток или капиллярной крови с коллоидным раствором таких поливалентных частиц даже ничтожная концентрация антител в сыворотке крови достаточна для возникновения заметной агглютинации. При визуализации реакции на фильтровальной бумаге «красная лента» мы получали следующую картину: при положительной реакции — плотный, компактный комплекс с четкой границей; при отрицательной реакции — распределение частиц реагирующих веществ без четкой границы в виде пятна.

Для постановки РГЗА использовали U-образные иммунологические планшеты, в лунках которых разводили и титровали сыворотки крови. Затем вносили равные аликвоты гидрозоля, перемешивали с помощью пипеточного дозатора. Через 3–5 минут осуществляли регистрацию результатов в планшете и на пористом носителе — фильтровальной бумаге (рис. 1).

Для сравнения мы применяли следующие референс-методы: микробиологические методы (микроскопия мазка и культуральный метод). Полученные результаты обработаны статистическими методами. При сравнении качественных признаков применялся критерий Мак-Нимара, при помощи метода распределения χ^2 (хи-квадрат) определяли теоретическую частоту положительных результатов эксперимента при равномерном распределении. Для выявления вида зависимости титра от концентрации применялся регрессионный анализ.

Общие принципы методологии исследования и отдельные детали приведены в работах авторов с коллегами [1–5].

Результаты

Исследование гидрозольных препаратов в задачах выявления специфических антител к *M. tuberculosis*. Работа проводилась в 3 этапа. На первом этапе формировали панели сывороток крови, взятых от 16 пациентов с установленным диагнозом «Туберкулез», подтвержденным клинико-лабораторными методами. Из них 90,0% от бацилярных больных с активной формой легочного туберкулезного процесса и 10,0% от пациентов с внелегочной формой туберкулеза (туберкулез среднего уха, мочевого пузыря, лимфаденит).

В качестве контрольной группы взяли 48 образцов сывороток здоровых доноров, в возрасте от 25 до 55 лет.

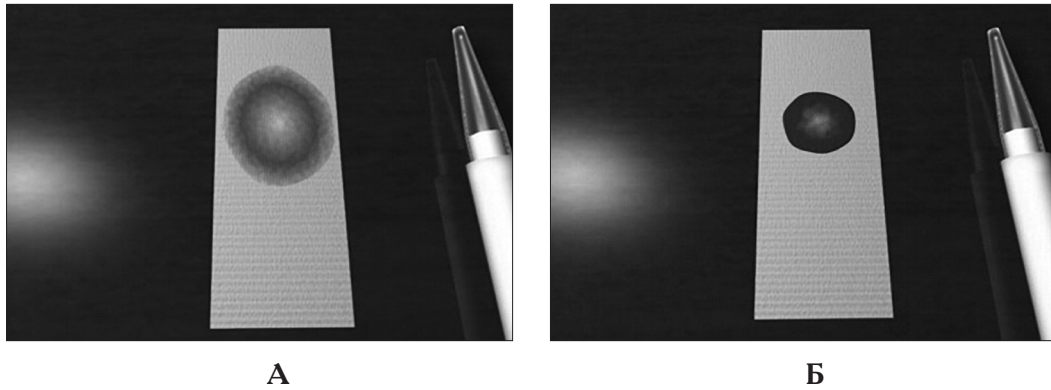


Рис. 1. Визуализация результатов на фильтровальной бумаге. А — отрицательная сыворотка, Б — положительная сыворотка. *Примечание:* гидрозоль окрашен в синий цвет

РГЗА проводилась как на основе берлинской лазури, так и оксида железа (Fe_3O_4). В каждом случае синтезировали гидрозоль с нативными антигенами ППД (Purified Protein Derivative) и рекомбинантными антигенами туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT) по вышеуказанной методике.

Получали четыре вида гидрозоль: гексацианферрат железа с адсорбированным рекомбинантным антигеном туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT),

гексацианферрат железа с ППД антигеном, оксид железа (Fe_3O_4) с рекомбинантным антигеном туберкулеза (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT), оксид железа (Fe_3O_4) с ППД антигеном.

Предварительно исследуемые сыворотки крови больных и здоровых доноров титровали от 1:20 до 1:2560.

Данные, полученные при изучении серопозитивных и серонегативных результатов к *M. tuberculosis*, представлены на рисунке 2.

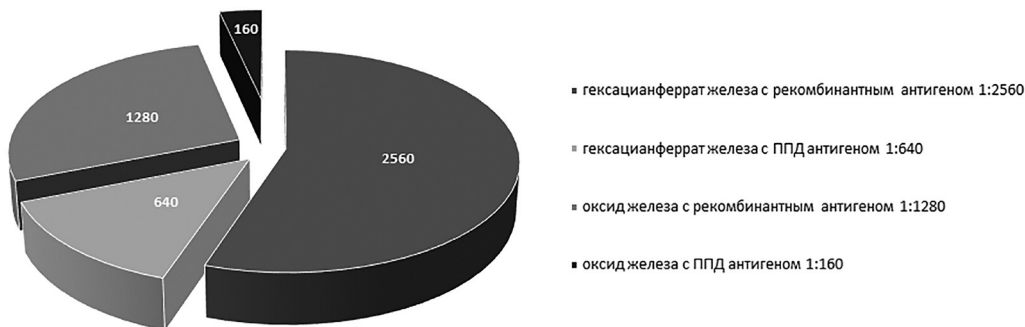


Рис. 2. Сравнение гидрозольных диагностикумов для детекции антител к возбудителю туберкулеза с различными биолигандами в РГЗА

Результаты постановок на первой панели показали, что все 4 гидрозоль фиксируют наличие специфических антител к *M. tuberculosis* в 16 пробах. Наиболее высокие титры в серопозитивных пробах были выявлены с гидрозольми на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe_3O_4) с адсорбированными рекомбинантными антигенами (1:2560 и 1:1280, соответственно, $p < 0,001$). В сравнении с гидрозольми на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe_3O_4) с адсорбированным нативным антигеном титры антител были ниже (1:640 и 1:160, соответственно, $p < 0,05$). При анализе показателей выявления титров специфических антител к *M. tuberculosis* установлены наиболее выраженные отличия в РГЗА с гидрозольми на основе

берлинской лазури с адсорбированными рекомбинантными антигенами.

На втором этапе, учитывая данные первых испытаний для реакции гидрозольной агглютинации, использовали только два гидрозоль с рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/ ρ CFP-ESAT), которые адсорбировали и на берлинскую лазурь, и на оксид железа (Fe_3O_4). Мы изучали панели сывороток от 20 больных с верифицированным диагнозом «Туберкулез», 20 здоровых доноров. Параллельно у 10 из них была исследована капиллярная кровь. При сравнении показателей, полученных в РГЗА, были обнаружены наиболее выраженные достоверные отличия между двумя гидрозольми. Гидрозоль на основе оксида железа

(Fe₃O₄) с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT) в данном испытании в капиллярной крови не сработал, а в сыворотке крови проявил слабую агглютинабельность — 10,0% от общего количества обследуемых. По результатам этой серии испытаний высокую чувствительность и специфичность показал гидрозольный препарат на основе берлинской лазури с рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT) как в сыворотке, так и в капиллярной крови. Реакцию агглютинации наблюдали со всеми сыворотками от 20 пациентов в разведении 1:1000 и с капиллярной кровью от 10 больных — в разведении 1:100. В данном случае с целью сравнения двух качественных признаков: «есть» или «нет», определенных у одних и тех же больных, была проведена статистическая обработка по критерию Мак-Нимара. В итоге было выявлено, что экспериментальные значения критерия больше критического, с вероятностью ошибки менее 0,01 (<1%). Таким образом, можно с достоверностью более 99% (мощность критерия >0,09) утверждать, что предложенный метод диагностики позволяет выявить антитела к *M. tuberculosis* при различной локализации возбудителя.

На третьем этапе для подтверждения результативности РГЗА в выявлении противотуберкулезных антител нами было проведено сравнение данных в параллельных исследованиях в качественных тестах: в реакции гидрозольной агглютинации. Проведено тестирование 44 проб (сывороток крови) от больных различными формами туберкулеза с разной локализацией и бактериологически подтвержденным диагнозом. В контрольную группу вошли 40 образцов, из которых взяли: 20 пациентов с заболеваниями сходных локализаций, но не имеющих туберкулеза в анамнезе (больные с хроническими бронхитами, бронхиальной астмой и другие); 20 — здоровые доноры. В данном случае в РГЗА использовали оптимальный, с нашей точки зрения, гидрозоль — берлинскую лазурь с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT). Постановка осуществлялась с заведомо положительными и отрицательными сыворотками крови в титрах 1:20–1:200 по вышеописанной методике. Обобщение полученных результатов обследования здоровых и больных лиц туберкулезом приведено в таблице 3.

При сравнении полученных данных исследования и нами изготовленного гидрозольного реагента установлен следующий факт. Указанный реагент показал чувствительность 91% (40/44) и специфичность 98% (39/40), а также хорошую корреляцию результатов с данными культурального и микробиологического методов (общая

согласованность данных = 96,6%). В ходе работы мы провели сравнительный анализ результатов традиционных и экспресс-анализов и их технико-экономическое обоснование, которые демонстрируют явные преимущества применения реакции гидрозольной агглютинации в выявлении антител к микобактериям туберкулеза.

Таблица 3

Обобщение полученных серопозитивных и серонегативных результатов в РГЗА

Культуральный и микробиологический методы	Реакция гидрозольной агглютинации (РГЗА)	
	Положительный	Отрицательный
Положительный: 44 сыворотки	40	4
Отрицательный: 40 сывороток	39	1
Общий результат: 84 сыворотки	79	5
Чувствительность	91% (40/44)	
Специфичность	98% (39/40)	

Таким образом, в ходе работы было выявлено, что наиболее эффективным экспрессным диагностиком в выявлении антител к *M. tuberculosis* как в сыворотке крови, так и в капиллярной крови является гидрозоль гексацианферрат II железа III (берлинская лазурь), с адсорбированными рекомбинантными антигенами (BL(DT3)/pCFP-ESAT).

Заключение

Проведенное исследование дает возможность сделать следующие выводы:

1. Разработан и апробирован новый иммунохимический метод гидрозольной агглютинации на основе берлинской лазури и оксида железа (Fe₃O₄) для выявления специфических антител к возбудителям туберкулеза как в сыворотке крови, так и в капиллярной крови.
2. Гидрозольные диагностикумы с нативным и генно-инженерным антигеном применимы в случае выявления антител к *M. tuberculosis*. При сравнении гидрозолей различного состава были обнаружены преимущества использования препарата на основе берлинской лазури с генно-инженерным антигеном.

Литература

1. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Диагностические препараты на основе коллоидного раствора гексацианферрата железа и оксида железа / Сборник научных трудов. Самара: СГМУ, 2010. — Самара, 2010, — С. 263–264.
2. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. и др. Усовершенствование методик выявления инфекционных и соматических патологий при помощи реакции гидрозольной агглютинации // Информационный лист № 43-024-08. — Киров: ЦНТИ, 2008. — С. 1–2.
3. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Изучение коллоидных растворов на основе гексацианферрата железа в качестве возможных диагностических препаратов // Вятский медицинский вестник. — Киров: КГМА, 2009. — № 1. — С. 111.
4. Попова С.В., Мешандин А.Г., Ворона М.В. Экспрессный бесприборный метод гидрозольной агглютинации // Вестник РГМУ. — 2010. — Специальный выпуск 2. — С. 536–537.
5. Попова С.В., Мешандин А.Г., Плехов В.Л., Якимова О.Н. Использование гидрозольных препаратов в качестве экспрессных бесприборных диагностикумов в выявлении антител к *M. tuberculosis* / Сб. Материалов Пятого съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова: Москва 2–4 декабря 2008 г. Под ред. Р.Г. Василовой. — Москва: ГОУ ВПО МГУЛ, 2009. — С. 283–284.

THE USE OF VARIOUS ANTIGENS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN HYDROSOL PREPARATIONS FOR RAPID IMMUNODIAGNOSTICS

A.G. MESHANDIN, V.S. BOLDYREV

Bauman State Technical University, Moscow, Russia

The results of application of *M. tuberculosis* antigens in combination with colloidal solid phases in the synthesis of hydrosol preparations for rapid immunodiagnosics are presented. The method can be used for analysis in the medical and agricultural industries and provide express diagnostics within 0.5–3.0 minutes.

Keywords: antigens, antibodies, express hydrosol immunoassay.