

1
НОМЕР

БОИЦ

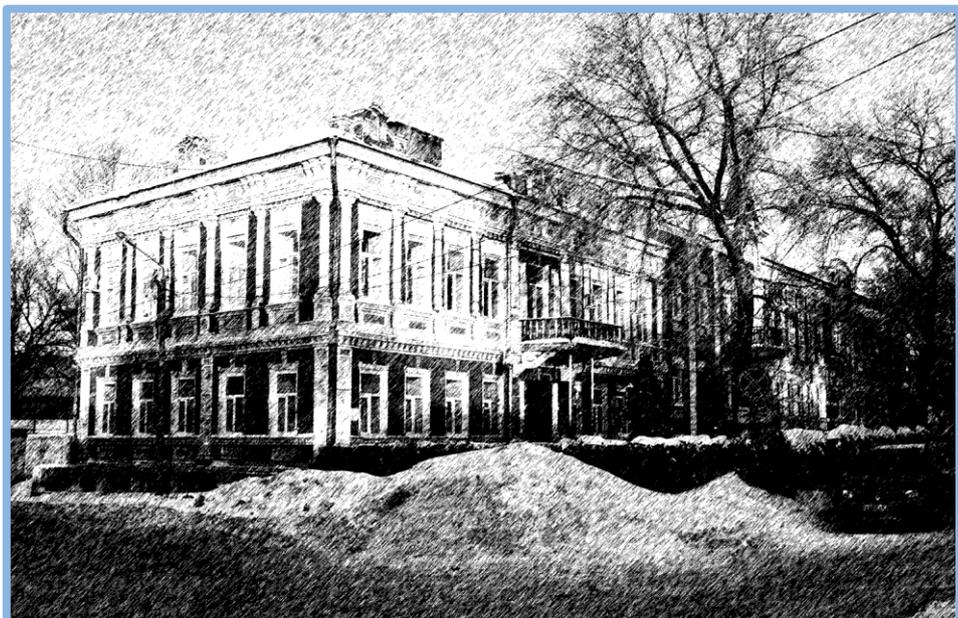
2016

ISSN 2304-9081

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК:616.915:616.071-097

П.В. Храмов², М.С. Бочкова¹, М.Б. Раев^{1,2}.

ТЕХНОЛОГИЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ НАПРЯЖЕННОСТИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Цель. Разработка модельной системы определения антител против коревой инфекции для оценки поствакцинального иммунитета.

Материалы и методы. Структурные свойства диагностикума с углеродными наночастицами, модифицированными бактериальным белком, биоспецифичным по отношению к IgG человека (G белок стрептококка) оценивали методами измерения обратного динамического светорассеяния и спектрофотометрии. Функциональную активность диагностикума оценивали по способности специфически связывать человеческий IgG, сорбированный на твердую фазу. Определяли оптимальные условия синтеза иммуносорбента, обеспечивающие наибольшую чувствительность детекции противокоревых антител. Исследовали стабильность иммуносорбента в процессе хранения.

Результаты. Оптимизирована процедура синтеза иммуносорбента, подобрана оптимальная концентрация коревого вируса для использования в качестве анти-лиганда, подобран буфер для нанесения анти-лиганда на твердую фазу. Разработан способ защиты и стабилизации иммуносорбента при долгосрочном хранении.

Заключение. Сконструирована модельная неинструментальная тест-система, предназначенная для оценки поствакцинального гуморального иммунитета к вирусу кори при помощи углеродных наночастиц.

Ключевые слова: корь, вакцинация, поствакцинальный иммунитет, серологическая диагностика, антитела, тест-система, углеродные наночастицы.

P.V. Khramtsov², M.S. Bochkova¹, M.B. Rayev^{1,2}

TECHNOLOGY FOR TEST-SYSTEM CONSTRUCTION TO EVALUATE INTENSITY OF POST-VACCINATION IMMUNITY TO MEASLES INFECTION

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

² Perm State National Research University, Perm, Russia

Objective. Development of model system to detect antibodies against measles infection to evaluate post-vaccination immunity.

Materials and Methods. Structure properties of diagnosticum with carbon nanoparticles modified by bacterial protein biospecific to human IgG (streptococcal G protein) were evaluated with reverse dynamic light scattering and spectrophotometry. Diagnosticum functional activity was estimated by its ability to specifically bind human IgG sorbed on a solid phase. Optimal conditions for the immunosorbent synthesis were determined that allowed approaching highest sensitivity of anti-measles antibody detection. Investigated stability the immunosorbent in the course of storage.

Results. Immunosorbent synthesis production has been optimized; optimal concentration of measles virus has been selected to be used as anti-ligand; buffer for anti-ligand application to solid phase has been chosen. Method for immunosorbent protection and stabilization has been

elaborated to be used for long-term storage.

Conclusion. Model non-instrumental test-system has been constructed intended to evaluate post-vaccination humoral immunity to measles virus using carbon nanoparticles.

Keywords: measles, vaccination, post-vaccination immunity, serological diagnostics, antibodies, test-system, carbon nanoparticles.

Введение

Корь является высоко контагиозной детской инфекцией, выступающей причиной сотен тысяч летальных случаев ежегодно. В настоящее время ВОЗ осуществляет активные мероприятия по снижению смертности от кори, предотвращению ее распространения и последующей элиминации. Основным инструментом борьбы с данным заболеванием является массовая иммунизация населения [1].

Серологический контроль за процессом вакцинопрофилактики позволяет эффективно оценивать её результативность на конкретных территориях и выявлять регионы с низким уровнем защиты населения от кори. В регионах, благополучных в отношении кори, серологическая диагностика является единственным инструментом, позволяющим оценить защищенность населения, поскольку уровень заболеваемости в этом случае не является показательным индикатором. Для серологического контроля напряженности иммунитета к кори в настоящее время используют ряд разновидностей иммунного анализа. Наиболее популярным является иммуноферментный анализ (ИФА). В Российской Федерации достаточно широко применяется реакция пассивной гемагглютинации (РПГА). Золотым стандартом анализа является реакция нейтрализации бляшкообразования вируса (РНБ) [2].

ИФА и РНБ являются высокочувствительными и высокоспецифичными методами диагностики, однако и они не лишены ряда принципиальных недостатков. Так, РНБ требует культивирования вируса кори, что сопряжено со значительными экономическими и временными затратами. ИФА более удобен и популярен вследствие своей унифицированной процедуры, достаточно высокой оперативности и дешевизны, но его использование в клинической практике ограничено потребностью в дорогостоящем считывающем оборудовании [3, 4]. РПГА является простым неинструментальным методом анализа, однако его чувствительность значительно уступает ИФА, к тому же постановка реакции гемагглютинации более трудозатратна из-за необходимости титрования исследуемого образца сыворотки крови [5].

В связи с этим весьма актуальной выглядит разработка метода оперативного серологического контроля состояния поствакцинального иммунитета к кори среди населения. Внедрение подобного инструмента в клиническую практику позволит осуществлять мониторинг эффективности иммунизации населения как на региональном уровне, так и в очагах коревой инфекции. Применение такой тест-системы даст возможность избежать избыточной иммунизации, оперативно выявлять людей, входящих в группы риска в отношении заболевания корью, а также оценивать качество используемых вакцин.

Цель – разработка модельной системы определения антител против возбудителя коревой инфекции для оценки поствакцинального иммунитета.

Материалы и методы

В качестве диагностического реагента использовали углеродные наночастицы, конъюгированные с бактериальными белками – G стрептококков и A стафилококков, которые обладают способностью относительно специфично связываться с Fc-фрагментами IgG человека [6]. Структурные свойства конъюгата оценивали методами измерения обратного динамического рассеяния света (ИОДРС) и спектрофотометрии. Размер функционализированных углеродных частиц измеряли методом ИОДРС раствора конъюгата углерод-белок G и углерод-белок A под углом 173° при помощи программно-аппаратного комплекса Malvern ZetaSizer NanoZS. Суспензию углеродных частиц разводили в 0,15 М растворе NaCl, забуференном Na-фосфатами, pH 7,25 (ЗФР) до концентрации 0,01%. Показатель количества измерений в секунду («Count rate») находился в диапазоне 300-400 тыс. Массовую долю углеродных частиц в суспензиях вычисляли, зная, что 0,03%-ная суспензия углеродных частиц имеет оптическую плотность 14 оптических единиц при длине волны 450 нм. Расчетным рабочим титром диагностикума считали разведение, при котором концентрация углеродных наночастиц в конечном растворе составляет 0,03%.

Функциональную активность диагностикума определяли по способности специфически связывать человеческий IgG, сорбированный на твердую фазу. Первоначально определяли оптимальные условия синтеза иммуносорбента, обеспечивающие наибольшую чувствительность детекции противокоревых антител. На диски из нитроцеллюлозной мембраны с диаметром пор 0,45 мкм сорбировали коревой антиген, представлявший собой инактивиро-

ванный препарат вируса кори вакцинного штамма Ленинград-16. Антиген сорбировали в двукратных серийных разведениях, начиная с концентрации, эквивалентной 100 ТЦД₅₀ (тканевых цитопатогенных доз). Критичным условием достижения максимальной эффективности сорбции антигена на твердую фазу является подбор буферного раствора. Тестировали ряд буферных растворов:

0,1 М NaCl, забуференный Na-фосфатами, pH 7,25 (0,1М ЗФР);

1,0 М NaCl, забуференный Na-фосфатами, pH 7,25 (1М ЗФР);

0,1 М NaCl, забуференный Na-карбонатами, pH 9,8 (0,1М КББ);

1,0 М NaCl, забуференный Na-карбонатами, pH 9,8 (1М КББ);

0,2 М ацетатный буфер, pH 4,0 (0,2М АБ).

В качестве модельных образцов сывороток крови использовали пул высокотитражных сывороток вакцинированных детей (позитивный образец) и пул сывороток, не содержащих антитела к вирусу кори (негативный образец). Препарат коревого вируса, разведенный в соответствующих буферах сорбировали на нитроцеллюлозную мембрану в объеме 3,5 мкл. Нитроцеллюлозные диски высушивали, трехкратно промывали 0,15 М NaCl, забуференным Na-фосфатами, pH 7,25, содержащим 0,1% твина-20 (ЗФРТ), затем инкубировали в течение 30 минут с серийными двукратными разведениями позитивного и негативного образца в ЗФРТ, начиная с разведения 1:50. По окончании инкубации диски промывали ЗФРТ, и проводили детекцию противокоревых антител углеродным диагностикумом на основе G белка в течение часа. Эксперимент проводили в трех повторностях. Результаты выражали в виде титров антител для позитивного и негативного образца. Титры определяли по последнему разведению сыворотки, которое давало окрашивание в зоне нанесения вируса на поверхности диска. Оптимальные условия сорбции препарата вируса и его концентрацию определяли по максимальному значению титра в позитивном образце и отсутствию сигнала в негативном образце.

На следующем этапе исследовали стабильность иммуносорбента, поскольку важным условием использования иммунодиагностической системы в клинической практике является стабильность его компонентов, обеспечивающая сохранение высокого уровня воспроизводимости, точности и достоверности результатов на протяжении срока годности набора. Сохранение диагностических свойств тест-набора в значительной степени определяется

стабильностью иммуносорбента и углеродного диагностикума. Стабильность углеродного диагностикума была исследована нами ранее, и показано, что длительное (более 5 лет) хранение при температуре $+2^{\circ}\text{C}\dots+8^{\circ}\text{C}$ не оказывает существенного влияния на его активность [7]. Стабильность иммуносорбента, которая ограничена динамикой деградации сорбированного антигена под воздействием факторов окружающей среды, бактериальных протеаз и т.д., зависит от природы антигена, его концентрации и условий сорбции на твердую фазу.

Для исследования стабильности иммуносорбента производили тестирование изменений его аналитических свойств в течение срока хранения. На диски из нитроцеллюлозной мембраны сорбировали препарат вируса кори в концентрации 10 ТЦД₅₀, разведенный в ЗФР, после чего диски высушивали. Далее часть дисков помещали в 30%-ный водный раствор сахарозы на 60 минут и высушивали в соответствии с оригинальной авторской методикой (патент РФ № 2327992) [6]. Необработанные и обработанные сахарозой диски хранили в запечатанных пластиковых пакетах с поглотителем влаги при температуре $+2^{\circ}\text{C}\dots+8^{\circ}\text{C}$ в течение полугода. Одновременно часть дисков, обработанных сахарозой, и необработанные диски использовали для постановки модельного анализа. Диски инкубировали с серийными разведениями позитивного и негативного образцов сывороток крови в течение получаса, а затем производили детекцию противокоревых антител углеродным диагностикумом. Эксперимент проводили в пяти повторностях.

Аналогичным образом осуществляли сравнение обработанных и не обработанных сахарозой дисков, заложенных на хранение, и необработанных свежеприготовленных дисков в эксперименте, проведенном спустя 6 месяцев. Стабильность иммуносорбента оценивали по наличию изменений титра позитивного образца.

Результаты и обсуждение

Измерение углеродных наночастиц методом ИОДРС показало нормальное распределение корпускул, конъюгированных с бактериальными белками G и A, по их размеру (рис. 1), а его среднее значение составило 97 нм, что соответствовало стандартному диапазону размеров конъюгированных углеродных частиц (80-110 нм).

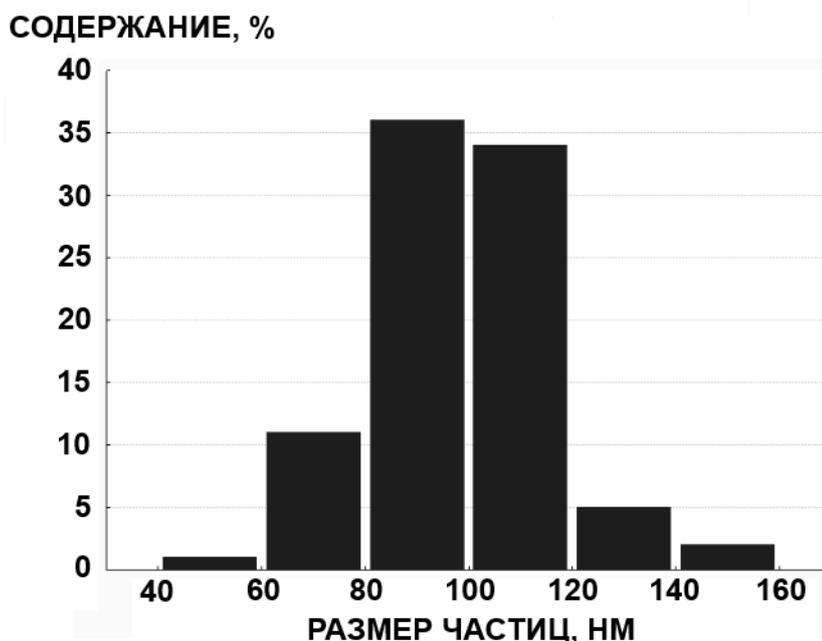


Рис.1. Гистограмма распределения размера углеродных наночастиц, конъюгированных с бактериальными белками G и A.

Функциональные свойства диагностикумов исследовали в эксперименте с прямой детекцией IgG человека, сорбированных на нитроцеллюлозную мембрану. Было продемонстрировано, что чувствительность детекции IgG составляет 180 нг/мл для конъюгата углерод-белок A и 90 нг/мл для конъюгата углерод-белок G (рис. 2).

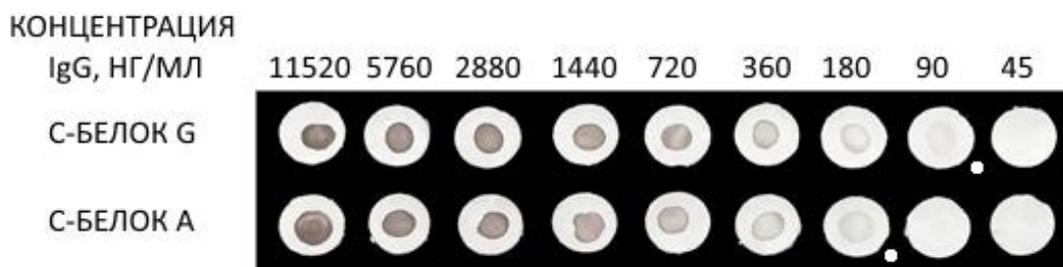


Рис.2. Определение чувствительности углеродных диагностикумов конъюгированных с бактериальными белками G и A в модели с прямой детекцией IgG человека.

Примечание: белой точкой помечена последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений IgG человека.

Специфичность детекции была доказана отсутствием сигнала в контрольной пробе (иммобилизированный на нитроцеллюлозе бычий сывороточный альбумин в концентрации 0,1 мг/мл).

Для достижения максимальной чувствительности тестирования в дальнейших исследованиях использовали углеродный диагностикум на основе G

белка стрептококков.

При подборе оптимальных условий сорбции коревого антигена было установлено, что наиболее эффективным является сенсibilизация твердой фазы 10 ТЦД50 вируса кори, разведенного в 0,1 М ЗФР. Чувствительность модельной системы определения противокоревых антител в позитивном образце составила 1:3200. В негативном образце сигнала не обнаружено (рис. 3).



Рис. 3. Влияние различных буферных растворов на интенсивность сигнала в модельной тест-системе определения противокоревых антител.

Примечание: 0,1M ЗФР-0,1 М NaCl, забуференный Na-фосфатами, pH 7,25; 1M ЗФР- 1,0 М NaCl, забуференный Na-фосфатами, pH 7,25; 0,1M КББ - 0,1 М NaCl, забуференный Na-карбонатами, pH 9,8; 1,0 М КББ – 1,0 М NaCl, забуференный Na-карбонатами, pH 9,8; 0,2M АБ - 0,2 М ацетатный буфер, pH 4,0. НС – негативная сыворотка. Белой точкой помечена последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений высокотитражных сывороток вакцинированных детей.

Эксперименты по изучению стабильности иммуносorbента в процессе хранения показали, что обработка сахарозой не оказывала влияния на специфичность и чувствительность анализа: титр позитивного образца составлял 1:3200 как при использовании свежеприготовленных обработанных сахарозой дисков (рис. 4А), так и при использовании необработанных дисков.

В то же время было подтверждено снижение чувствительности детекции противокоревых антител при использовании для иммуноанализа необработанных дисков, хранившихся в течение полугода при температуре +2°C...+8°C: титр позитивного образца составил 1:800 (рис. 4Б).



Рис. 4. Тестирование стабильности нитроцеллюлозных иммуносорбентов при хранении.

Примечание: А - свежесинтезированные сенсibilизированные 10 ТЦД50 вируса кори диски, обработанные 30% сахарозой; Б – сенсibilизированные 10 ТЦД50 вируса кори диски, не обработанные 30% сахарозой, и хранившиеся в течение полугода при температуре +2°C – +8°C; В - сенсibilизированные 10 ТЦД50 вируса кори диски, обработанные 30 % сахарозой, и хранившиеся в течение полугода при температуре +2°C – +8°C. НС – негативная сыворотка. Белой точкой помечена последняя визуализируемая точка в ряду серийных разведений высокотитражных сывороток вакцинированных детей.

Обработка иммуносорбента 30%-ным раствором сахарозы, хранившимся в течение полугода, предотвращала снижение чувствительности детекции противокоревых антител: титр положительного образца был равен 1:3200 (рис. 4В).

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных исследований были синтезированы и охарактеризованы основные компоненты иммуноаналитической системы детекции противокоревых антител – иммуносорбент и диагностический реагент, а также оптимизирована процедура синтеза иммуносорбента и разработан способ его стабилизации при долгосрочном хранении.

(Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН "Фундаментальные науки – медицине", проект № 15-3-4-14)

ЛИТЕРАТУРА

1. Durrheim D., Crowcroft N., Strebel P. Measles – The epidemiology of elimination. *Vaccine*. 2014. 32(51): 6880-6883.
2. Bellini W., Helfand R. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis*. 2003. 187: 283-290.
3. Ratnam S., Gadag V., West R. et al. Comparison of commercial enzyme immunoassay kits with plaque reduction neutralization test for detection of measles virus antibody. *J. of Clin.*

- Microbiol. 1995. 33: 811-815.
- Cohen B., Parry R., Doblaz D. et al. Measles immunity testing: comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay. *J. Virol Methods*. 2006. 131: 209-212.
 - Neumann P., Weber J., Jessamine A. et al. Comparison of measles antihemolysin test, enzyme-linked immunosorbent assay, and hemagglutination inhibition test with neutralization test for determination of immune status. *J. Clin. Microbiol.* 1985. 22(2): 296-298.
 - Раев М.Б. Нанобиотехнологии в неинструментальной иммуноаналитике. Екатеринбург: УрО РАН. 2012. 140 с.
 - Раев М.Б., Храмов П.В., Бочкова М.С. Исследование размеров углеродных наночастиц, ковалентно функционализированных белковыми макромолекулами. *Российские нанотехнологии*. 2015. 10(1-2): 116-122.

Поступила 22.12.2015

(Контактная информация: Храмов Павел Викторович – ассистент кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета; адрес: 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15, тел./факс 8 (342) 2807794, e-mail: khramtsov Pavel@yandex.ru;

Бочкова Мария Станиславовна – к.б.н., научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, тел./факс 8 (342) 2807794, e-mail: krasnykh-m@mail.ru;

Раев Михаил Борисович – д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, тел./факс 8 (342) 2807794, профессор кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета, 614990 г. Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: mraev@iegm.ru)

LITERATURA

- Durrheim D., Crowcroft N., Strebel P. Measles – The epidemiology of elimination. *Vaccine*. 2014. 32(51): 6880-6883.
- Bellini W., Helfand R. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis*. 2003. 187: 283-290.
- Ratnam S., Gadag V., West R. et al. Comparison of commercial enzyme immunoassay kits with plaque reduction neutralization test for detection of measles virus antibody. *J. of Clin. Microbiol.* 1995. 33: 811-815.
- Cohen B., Parry R., Doblaz D. et al. Measles immunity testing: comparison of two measles IgG ELISAs with plaque reduction neutralisation assay. *J. Virol Methods*. 2006. 131: 209-212.
- Neumann P., Weber J., Jessamine A. et al. Comparison of measles antihemolysin test, enzyme-linked immunosorbent assay, and hemagglutination inhibition test with neutralization test for determination of immune status. *J. Clin. Microbiol.* 1985. 22(2): 296-298.
- Raev M.B. Nanobiotekhnologii v neinstrumental'noj immunoanalitike. Ekaterinburg: UrO RAN. 2012. 140 s.
- Raev M.B., Hramcov P.V., Bochkova M.S. Issledovanie razmerov uglerodnyh nanochastic, kovalentno funkcionalizirovannyh belkovymi makromolekulami. *Rossijskie nano-tehnologii*. 2015. 10(1-2): 116-122.

Образец ссылки на статью:

Храмов П.В., Бочкова М.С., Раев М.Б. Технология конструирования тест-системы для оценки напряженности поствакцинального иммунитета против коревой инфекции. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 1: 1-9 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/MBR-2016-1.pdf>).