

На правах рукописи

ВЯЗНИКОВА

Татьяна Владимировна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ АВИДИН-БИОТИНОВОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
(ДИФТЕРИЙНЫХ, СТОЛБНЯЧНЫХ, КОКЛЮШНЫХ, АНТИ-HBS)**

14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Екатеринбург - 2007

Работа выполнена в Филиале Федерального государственного унитарного предприятия «НПО «Микроген» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Пермское НПО «Биомед»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Николаева Алевтина Максимовна

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Родионов Сергей Юрьевич

кандидат биологических наук
Орлова Екатерина Григорьевна

Ведущая организация: ФГУН Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, г. Москва.

Защита состоится « ____ » _____ 2007 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 004.027.01 при Институте иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620041, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 91.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской-Академическая, 22/20), с авторефератом можно ознакомиться на официальном сайте Института иммунологии и физиологии УрО РАН – <http://www.iip.uran.ru>.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

И.А. Тузанкина

Актуальность проблемы

Вакцинопрофилактика рассматривается в настоящее время не только как эффективное, наиболее доступное и экономичное средство в борьбе с инфекциями, но и как средство достижения активного долголетия во всех социальных группах населения развитых и развивающихся стран (Бектимиров Т.А., 2001; Медуницын Н.В., 2004; Онищенко Г.Г., 2006). Успех программ вакцинопрофилактики во многом определяется эффективностью эпидемиологического надзора за управляемыми инфекциями, в котором важная роль принадлежит серологическому мониторингу специфического антиинфекционного иммунитета (Семенов Б.Ф., 1996; Покровский В.И., 1999; Фельдблюм И.В., 2005).

В соответствии с рекомендациями ВОЗ ряд стран (Финляндия, Швеция, Дания, Польша, Австралия, Япония и др.) включили серологический мониторинг в систему эпидемиологического надзора за инфекциями, управляемыми средствами специфической профилактики (Селезнева Т.С., 2004).

Современным требованиям эпидемиологической практики в значительной степени отвечает иммуноферментный анализ (ИФА), который позволяет организовать эффективную систему диагностики иммунитета на основе точной инструментальной оценки уровня специфических антител (Aybaу С., 2003).

В отечественных иммуноферментных тест-системах и большинстве зарубежных, рассчитанных на определение антител различной специфичности в сыворотках крови человека, используются варианты твердофазного ИФА, основанные на фиксации антител на нерастворимой основе (обычно полистироловых планшетах с иммобилизованным антигеном) с последующим тестированием связанных антител при помощи индикаторной системы - конъюгатов антивидовых антител (против иммуноглобулина G человека) с ферментами-маркерами.

Однако технология приготовления антивидовых антител, связанная с использованием животных, очень сложна, длительна по времени, трудоемка и вследствие этого высокочрезвычайно затратна. Кроме того, к недостаткам систем с антивидовыми конъюгатами относятся и неспецифические взаимодействия, которые могут иметь место между антиглобулином, меченым ферментом, и гетероло-

гичным иммуноглобулином, присутствующим в клиническом образце, либо с антителом, фиксированным на твердой фазе (Yolken R.H., 1985).

В связи с этим актуален поиск новых эффективных и технологичных путей синтеза ферментных конъюгатов.

Перспективным направлением в ИФА является использование амплифицирующей системы авидин-биотин. Исследователи отмечают, что при применении авидин-биотиновых конъюгатов достигается чрезвычайно высокая чувствительность и специфичность определения, а также в значительной степени снижаются фоновые реакции (Lynn F., 1996; Aybay C., 2003).

Цель исследования – экспериментально обосновать и сконструировать твердофазные иммуноферментные тест-системы для определения антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs) на основе амплифицирующего комплекса авидин-биотин.

Задачи исследования

1. Разработать эффективный и технологичный способ приготовления конъюгата.
2. Сконструировать оптимальные композиции иммуноферментных тест-систем на основе амплифицирующего авидин-биотинового комплекса.
3. Оценить качество разработанных тест-систем по следующим критериям: линейность и параллелизм, чувствительность, специфичность, точность, сравнение с референс-методами.
4. Определить область применения разработанных иммуноферментных тест-систем.

Научная новизна

1. Впервые предложен универсальный антиглобулиновый маркер на основе белка А золотистого стафилококка, меченного биотином. Показана возможность эффективного применения сконструированного конъюгата для определения антител различной специфичности (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs) в сыворотках крови человека и животных.

2. Экспериментально обоснована и разработана оригинальная конструкция иммуноферментной тест-системы для выявления анти-НВs с использованием биотинилированного конъюгата на основе рекомбинантного НВsAg (патент № 2206095 от 10.06.03 г.).

3. Впервые разработана оригинальная конструкция иммуноферментной тест-системы для определения коклюшных антител на основе биотинилированного белка А (приоритетная справка № 2006127549 от 31.07.2006 г.).

Практическая значимость работы

1. Разработана технология приготовления универсальных конъюгатов на основе биотинилированных белка А и рекомбинантного НВsAg, не требующая больших экономических затрат.

2. Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на производство тест-системы иммуноферментной для выявления антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (Фармакопейная статья № 42-0504656005, Производственный регламент № 04862997-79-06). Получено регистрационное удостоверение (ЛС-000884 от 03.11.2005 г.) и лицензия на производство (99-04-000097 от 27.10.2005 г.).

3. Использование разработанных тест-систем обеспечивает эффективный серологический мониторинг за инфекциями, управляемыми средствами иммунопрофилактики, на основе количественной оценки уровня специфических антител.

4. Изданы и внедрены в работу территориальных отделов Управления Роспотребнадзора по Пермскому краю и ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» методические рекомендации «Эпидемиологический надзор и контроль за коклюшной инфекцией».

Положения, выносимые на защиту

1. Получены универсальные конъюгаты и сконструированы на их основе иммуноферментные тест-системы для индикации специфических антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs).

2. Разработанные тест-системы соответствуют критериям, предъявляемым ВОЗ к наборам для иммунологических испытаний (линейность и парал-

лелизм, чувствительность, специфичность, точность, сравнение с референс-методами).

3. Определена область применения разработанных иммуноферментных тест-систем.

Апробация диссертации

Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на VIII Всероссийском съезде эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (г. Москва, 2002); Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке» (г. Пермь, 2003); XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2004); Научно-практической конференции «Современная вакцинопрофилактика: проблемы и перспективы развития» (г. Пермь, 2005); Международной научной конференции «Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий» (г. Томск, 2006); Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2006).

Диссертация прошла экспертизу и апробирована на заседании Научно-технического совета филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» в 2006 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК - 1, 1 методические рекомендации, получен 1 патент Российской Федерации и 1 приоритетная справка по заявке на патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, главу материалы и методы, три главы собственных исследований, заключение, выводы, приложение. Указатель литературы содержит 276 источников, из них 185 отечественных и 91 иностранных. Текст иллюстрирован 23 рисунками и 33 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Препараты и реагенты

При конструировании иммуноферментных тест-систем были использованы препараты производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» (анатоксин дифтерийный очищенный концентрированный; анатоксин столбнячный очищенный концентрированный; нативная коклюшная суспензия (взвесь убитых формалином коклюшных микробов 1 фазы); антивидовой конъюгат (F(ab')₂-фрагменты аффинноочищенных антител лошади против IgG человека, меченные пероксидазой хрена); белок А золотистого стафилококка); поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) производства ЗАО НПК «Комбиотех» (г. Москва), а также реагенты производства фирмы «Sigma», США (пероксидаза хрена высокоочищенная; 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; авидин-пероксидаза; диметилсульфоксид; N-гидроксисукцинимидобиотин); полистироловые планшеты однократного применения фирмы «Costar» (США), а также конъюгат белок А, меченный пероксидазой хрена, полученный по методу Накане (Nakane P.K., 1974).

Тест-системы сравнения

Определение анти-HBs проводили с помощью тест-систем MONOLISA[®] anti-HBs 3.0 (Франция) и “AUSAB[®] EIA” (США) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к наборам.

Контрольные образцы

Контрольные положительные образцы (K+) - сыворотки крови с известным содержанием специфических антител, установленным в прецизионном тесте (дифтерийные и столбнячные антитела - в реакции нейтрализации *in vivo*, коклюшные антитела – в реакции агглютинации, а для «ИФА анти-В» - сыворотка, откалиброванная по ОСО 42-28-320-00 «Иммуноглобулин человека против вируса гепатита В»).

Контрольные отрицательные образцы (К-) - сыворотки крови, не содержащие специфических антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-НВs).

Образцы сывороток крови, исследованные на наличие специфических антител

Группы обследованных	Количество проб
Здоровые взрослые и дети	466
Дети и взрослые, иммунизированные комбинированными вакцинами (АКДС, АДС-М, Бубо-М, Бубо-Кок) и вакциной гепатита В (ВГВ)	612
Взрослые и дети, контактные с источником возбудителя НВV-инфекции в эпидемических очагах	337
Дети с подозрением на коклюш (группа наблюдения) и дети с заболеванием не коклюшной этиологии (группа сравнения)	100
Больные с легким и среднетяжелым течением острой формы гепатита В	679
Кролики, иммунизированные вакциной гепатита В (ВГВ) и иммуноглобулином человека против гепатита В (Антигеп)	220
Морские свинки, иммунизированные комбинированными вакцинами (АКДС, АДС-М, Бубо-М, Бубо-Кок, Инфанрикс) и вакциной гепатита В (ВГВ) и не иммунизированные морские свинки (контрольная группа)	165
Мыши, иммунизированные комбинированными вакцинами (Бубо-М, АКДС-Геп В) и вакциной гепатита В (ВГВ) и не иммунизированные мыши (контрольная группа)	712

В работе были использованы также иммуноглобулины (нормальный, противостафилококковый, противозэнцефалитный, противостолбнячный, против гепатита В (Антигеп)) производства филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» (г. Пермь) - 20 серий.

Методы

Реакция нейтрализации (РН). Определение титра дифтерийных и столбнячных антител в сыворотках крови людей и животных проводили с помощью биологического теста – реакции нейтрализации дифтерийного токсина на морских свинках, столбнячного токсина - на белых мышах (Методическое

руководство по лабораторной оценке качества бактериальных и вирусных препаратов, 1972).

Реакция агглютинации (РА). Проводили по общепринятой методике с помощью диагностикума коклюшного жидкого для реакции агглютинации производства АООТ «Биомед» им. И.И. Мечникова (Моск. обл., Петрово-Дальнее).

Учет результатов реакции иммуноферментного анализа (ИФА). Результаты ИФА регистрировали на спектрофотометре PR 2100 производства фирмы “Sanofi Diagnostics Pasteur” (Франция) при двух длинах волн 450/620 нм.

Определение концентрации специфических антител проводили по градуировочному графику, построенному в координатах: $y - \lg$ оптической плотности положительного контрольного образца, $x - \log_2$ кратности его разведения (рис. 1).

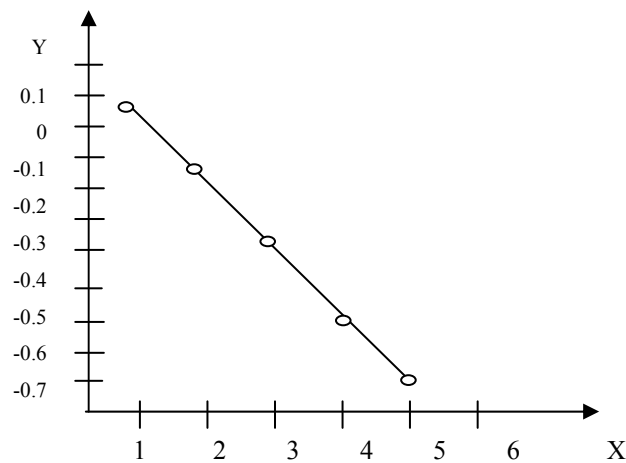


Рис. 1. Градуировочный график

Далее находили концентрацию антител в исследуемом образце по следующей формуле:

$$T = \frac{T_1 \times B}{A \times 100}, \text{ где}$$

T — концентрация антител в исследуемом образце, МЕ/мл; T_1 — концентрация антител в положительном контрольном образце; A — кратность разведения положительного контрольного образца; $A \times 100$ — разведение положительного кон-

трольного образца; В – разведение исследуемого образца, в котором определялась оптическая плотность.

Кроме того, была использована компьютерная программа количественного определения специфических антител, созданная на основании разработанного алгоритма обработки результатов ИФА (Николаева А.М., 2003).

Следует отметить, что учет результатов иммуноферментной реакции стандартизован таким образом, что позволяет оценить содержание дифтерийных и столбнячных антител в исследуемых образцах в МЕ/мл, анти-НВs – в мМЕ/мл, коклюшных антител – в ИЕ/мл (иммуноферментные единицы).

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики. В работе использовали электронные таблицы Excel для Windows (Microsoft), пакет статистических программ “DIASTA” (МГУ, Россия), являющегося версией пакета "STADIA", программу статистической обработки результатов ИФА методом параллельных линий (ГИСК им. Л.А. Тарасевича), программу БИОСТАТ для Windows (Microsoft), версия 4.03 (Гланц С., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важнейших моментов в программе конкретных инженерных разработок иммуноферментного метода определения специфических антител является выбор оптимальных реагентов для основных составляющих тест-систем – конъюгатов.

В своих исследованиях мы пошли по пути создания конъюгата на основе белка А, обладающего уникальной способностью образовывать прочный комплекс с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека и различных млекопитающих (Акатов А.К., 1983; Азаренок К.С., 1987). Выбор этого реагента в значительной степени был обусловлен тем, что в Пермском НПО «Биомед» разработана оригинальная промышленная технология получения белка А, не уступающего по своим качественным характеристикам препаратам зарубежных фирм (Sigma, Pharmacia).

Известно, что один из наиболее эффективных методов введения ферментной метки основан на использовании авидина и биотина, образующих между собой комплекс, характеризующийся константой связывания 10^{15} M^{-1} , что в десятки тысяч раз превышает характеристики связи антиген-антитело (Bayer A., 1980).

В связи с этим были проведены эксперименты по отработке оптимальной методики биотинилирования белка А, в результате которых была обоснована технология приготовления стандартных препаратов белка А, меченных биотином.

Основные физико-химические параметры ИФА, а именно чувствительность, точность и воспроизводимость, могут существенно изменяться при варьировании условий проведения эксперимента, что обуславливает необходимость оптимизации каждой стадии анализа.

Для определения оптимальных условий проведения иммуноферментной реакции были исследованы варианты возможных реагентов и параметры их применения: выбор антигенов, блокирующего агента, системы детекции, субстрата; определены оптимальные концентрации реагентов, состав, рН буферных растворов, а также оптимальная температура и время проведения отдельных этапов реакции.

На первом этапе работы были определены условия иммобилизации каждого из исследованных антигенов на твердую фазу (табл. 1).

Таблица 1

Оптимальные условия приготовления иммуносорбента

	Определяемые антитела			
	анти-НВs	дифтерийные	столбнячные	коклюшные
Твердая фаза	96-луночные полистироловые планшеты			
Иммобилизирующий буферный раствор	фосфатно-солевой, рН 7,2-7,4	карбонатно-бикарбонатный, рН 9,6		
Антиген	рекомбинантный НВsAg	дифтерийный анатоксин	столбнячный анатоксин	взвесь убитых формалином коклюшных микробов 1 фазы
Концентрация белка	1 мкг/мл	10 мкг/мл	10 мкг/мл	5 млрд. кл./мл
Условия сорбции	2 суток при температуре 2-8 °С			
Срок хранения	12 месяцев при температуре 2-8 °С			

В следующей серии модельных экспериментов была проведена сравнительная оценка полученного конъюгата на основе биотинилированного белка А и конъюгатов, меченных пероксидазой хрена (антивидовой и белок А-пероксидаза).

При оценке различных конъюгатов использовали коэффициент позитивности (КП) - отношение средней оптической плотности положительных контрольных образцов к средней оптической плотности отрицательных контрольных образцов (ОП К⁺ / ОП К⁻). Оптимальным считали конъюгат, при использовании которого КП составлял не менее 10,0; а оптическая плотность К⁻ была не более 0,150 (табл. 2).

Таблица 2

Сравнительная оценка конъюгатов

Определяемые антигена	Конъюгат								
	антивидовой			белок А-биотин			белок А-пероксидаза		
	КП	ОП К ⁻	чувствительность*	КП	ОП К ⁻	чувствительность*	КП	ОП К ⁻	чувствительность*
дифтерийные	27,3 ±2,4	0,053 ±0,005	0,2-0,5 мМЕ/мл	18,8 ±1,4	0,045 ±0,003	0,3-0,5 мМЕ/мл	15,5 ±1,8	0,084 ±0,009	0,3-0,5 мМЕ/мл
столбнячные	30,2 ±3,0	0,054 ±0,006	0,2-0,5 мМЕ/мл	28,4 ±2,1	0,055 ±0,004	0,2-0,5 мМЕ/мл	30,7 ±3,0	0,062 ±0,006	0,2-0,5 мМЕ/мл
коклюшные	19,0 ±0,7	0,061 ±0,002	0,01-0,05 ИЕ/мл	19,8 ±1,1	0,061 ±0,003	0,01-0,05 ИЕ/мл	7,6 ±0,3	0,211 ±0,009	0,1-0,5 ИЕ/мл
анти-НВs	5,1 ±0,2	0,265 ±0,012	25,0-50,0 мМЕ/мл	6,5 ±0,3	0,275 ±0,013	25,0-50,0 мМЕ/мл	4,9 ±0,3	0,325 ±0,019	25,0-50,0 мМЕ/мл

* Примечание: минимальный защитный уровень дифтерийных антигенов составляет 30 мМЕ/мл, столбнячных и анти-НВs – 10 мМЕ/мл.

Из представленных данных видно, что все исследованные конъюгаты обеспечивали достаточную чувствительность анализа при определении дифтерийных и столбнячных антигенов. При использовании конъюгата белок А-пероксидаза при определении коклюшных антигенов наблюдался высокий уровень фоновых реакций (ОП К⁻ более 0,150), тогда как при применении конъюгатов белок А-биотин и антивидового уровня фоновых реакций был низким (ОП К⁻ менее 0,150).

Кроме того, было установлено, что все исследованные конъюгаты не обеспечивали необходимой чувствительности анализа при определении анти-НВs в сыворотках крови человека.

В связи с этим были проведены эксперименты по созданию конъюгата для определения анти-НВs на основе биотинилированного рекомбинантного НВsAg. Результаты оценки полученного конъюгата представлены в таблице 3.

Таблица 3

Оптимизация параметров проведения ИФА с помощью тест-системы на основе конъюгата НВsAg-биотин

Раствор для разведения сывороток и конъюгата	Оптическая плотность		Чувствительность*, мМЕ\мл
	К+	К-	
Фосфатно-солевой буферный раствор, рН 7,2-7,4	1,057	0,311	25,0-50,0
Раствор отрицательной сыворотки в фосфатно-солевом буфере, рН 7,2-7,4	1,024	0,055	3,1-5,5

* Примечание: оценку чувствительности проводили с помощью ОСО 42-28-320-00 «Иммуноглобулин человека против вируса гепатита В».

Таким образом, в результате проведенных исследований разработана конструкция ИФТС, основанная на взаимодействии антигена (дифтерийного, столбнячного, коклюшного или НВsAg), иммобилизованного на полистироловом планшете с антителами, содержащимися в сыворотке крови человека или животных. После фиксации на твердой фазе специфических реагирующих антител не прореагировавшие компоненты системы удаляют из сферы реакции путем последовательных промывок белково-солевым раствором с детергентом. Образовавшийся комплекс антиген-антитело выявляют с помощью амплифицирующей авидин-биотиновой системы, состоящей из белка А или НВsAg, меченных биотином и авидина, меченного пероксидазой хрена, которая обуславливает гидролиз перекиси водорода, регистрируемой по изменению окраски индикатора (ТМБ) (рис. 2).

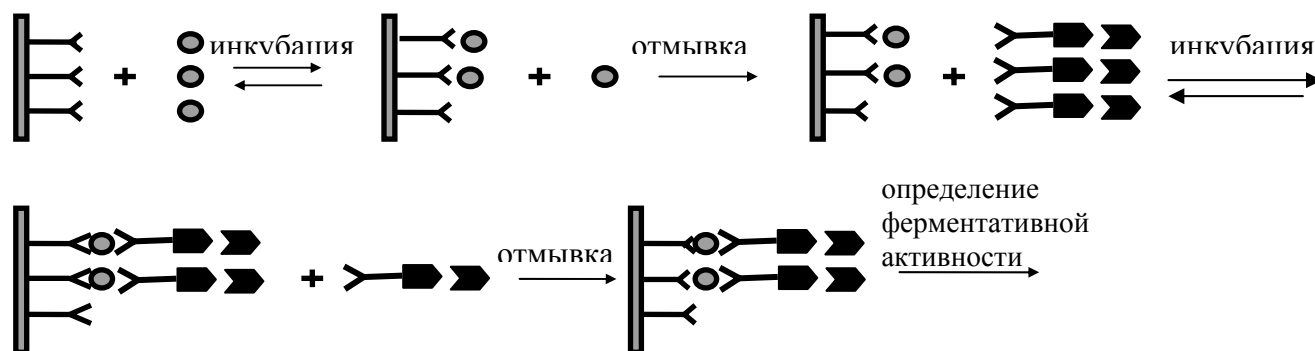


Рис.2. Схема проведения твердофазного авидин-биотинового ИФА

Условные обозначения:

- АГ – антиген;
- АТ – антитело;
- биотин;
- авидин;
- конъюгат (белок А (или HBsAg), меченный биотином + авидин, меченный пероксидазой).

Важно отметить, что все разработанные ИФТС содержат универсальные реагенты (табл. 4), а методика постановки ИФА основана на одинаковом наборе манипуляций, что существенно упрощает их применение.

Таблица 4

Состав разработанных иммуноферментных тест-систем

Компонент	ИФТС			
	ИФА анти-В*	ИФА анти-Д	ИФА анти-С	ИФА анти-К
Иммуносорбент	рекомбинантный дрожжевой HBsAg	дифтерийный анатоксин	столбнячный анатоксин	взвесь убитых формалином коклюшных микробов 1 фазы
Раствор для промывания планшетов, разведения сывороток и конъюгата	Фосфатно-солевой буферный раствор с твином-20 рН 7,0-7,4			
Блокатор	Белково-солевой раствор на основе казеина			
Положительный контрольный образец	Сыворотка крови, содержащая специфические антитела			
Отрицательный контрольный образец	Сыворотка крови, не содержащая специфических антител			
Конъюгат	Белок А, меченный биотином, и авидин-пероксидаза			
Субстратный буферный раствор	Цитратно-фосфатный буферный раствор с перекисью водорода			
Хромоген	3,3',5,5'-тетраметилбензидин			
Стоп-реагент	Серная кислота			

Примечания: * используется также конструкция ИФТС, содержащая в качестве конъюгата биотинилированный рекомбинантный HBsAg.

При создании любой ИФТС необходимо быть уверенным в том, что ее характеристики позволяют использовать ее для решения конкретных задач. Подобная оценка должна быть проведена в форме валидации, которая является важной частью системы обеспечения и контроля качества тест-систем (Давлетбаева Л.Р., 2006).

Валидационные исследования были проведены в соответствии с требованиями ВОЗ, предъявляемыми к наборам для иммунологических испытаний.

Дисперсионный анализ показал наличие линейности и параллелизма результатов измерения анализируемого вещества и положительного контрольного образца (калибрователя) (табл. 5, рис. 3).

Таблица 5

Результаты сравнения положительного и исследуемого образцов, содержащих анти-НВs, с ОСО 42-28-320-00

ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ						
Источник вариации	Степень свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	F-теор.	F-экспер.	Вывод
Измерения (дозы)	24	7,3102	0,3046	2,0825	297,7154	Значимо
Препараты	4	0,0985	0,0246	2,8661	24,0637	Значимо
Линейная регрессия	1	7,1770	7,1770	4,3513	7014,997	Значимо
ПАРАЛЛЕЛИЗМ	4	0,0065	0,0016	2,8661	1,5874	ДА
ЛИНЕЙНОСТЬ	15	0,0282	0,0019	2,2033	1,8379	ДА
Остаточная ошибка	20	0,0205	0,0010			
Total	44	7,3307				

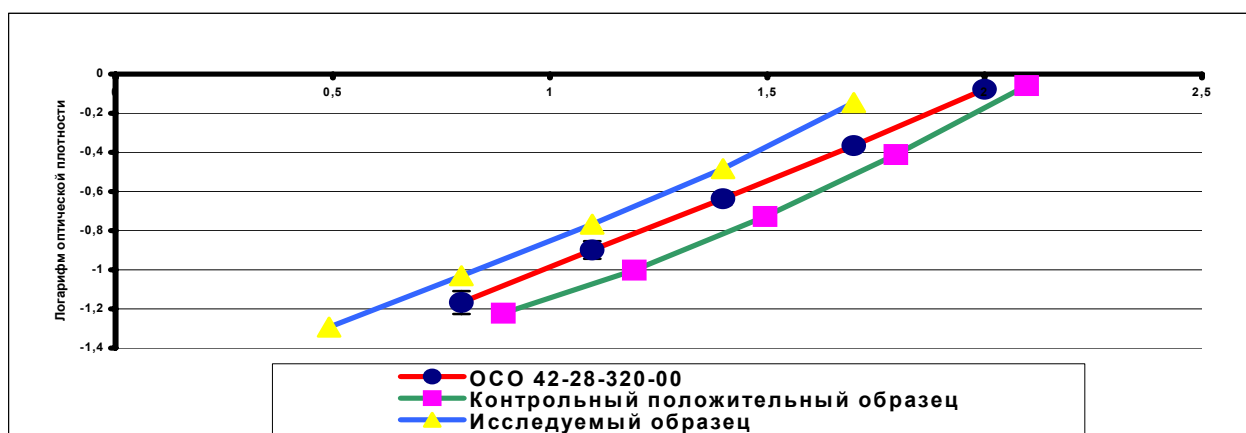


Рис. 3. Сравнение контрольного положительного и исследуемого образцов с ОСО 42-28-320-00

Полученные нами данные указывают, что все исследованные образцы обладают общепринятыми критериями стандартов антител – линейным участком кривой «доза-ответ» (прямая линия) в пяти точках и параллелизмом кривых при смещении разведения при тестировании в ИФА. Аналогичные результаты были получены для всех разработанных ИФТС.

Специфичность разработанных тест-систем была подтверждена в тесте блокирования. Предварительная инкубация положительных контрольных образцов с различными антигенами приводила к существенному блокированию их активности в ИФА только при использовании антигена, специфичного для тестируемых антител (табл. 6).

Таблица 6

Оценка специфичности тест-систем в тесте блокирования

Блокатор реакции	Определяемые антитела							
	Дифтерийные		Столбнячные		Коклюшные		анти-НВs	
	ОПК ⁺ опыт	ОПК ⁺ кон- троль	ОПК ⁺ опыт	ОПК ⁺ кон- троль	ОПК ⁺ опыт	ОПК ⁺ кон- троль	ОПК ⁺ опыт	ОПК ⁺ кон- троль
Дифтерий- ный анаток- син	0,062	0,954	0,975	0,931	0,870	0,905	1,009	1,062
Столбняч- ный анаток- син	0,921	0,943	0,072	0,986	0,904	0,947	0,963	0,985
Коклюш- ная суспен- зия	0,941	0,912	0,904	0,914	0,087	0,923	1,079	1,030
НВsAg	0,944	0,932	0,992	0,934	0,951	0,969	0,086	1,054

Точность результатов измерений в пределах одной серии испытаний (внутрипостановочный коэффициент вариации - ВКВ) и разных серий испытаний (межпостановочный коэффициент вариации - МКВ) для разработанных тест-систем была весьма высокой – коэффициенты вариации не превышали 10 %. Была установлена также высокая степень корреляции результатов параллельного исследования сывороток с помощью разработанных ИФТС и регла-

ментированных методов (реакцией нейтрализации при определении дифтерийных и столбнячных антител, реакции агглютинации при определении коклюшных антител, а также с импортными тест-системами при определении анти-НВs) (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика разработанных тест-систем

ИФТС	Точность (коэффициент вариации), %						Коэффициент корреляции
	Образец 1		Образец 2		Образец 3		
	ВКВ	МКВ	ВКВ	МКВ	ВКВ	МКВ	
ИФА анти-В	3,3	4,3	5,0	7,6	5,7	9,5	0,93
ИФА анти-Д	7,0	7,5	5,5	7,8	3,8	5,9	0,92
ИФА анти-С	6,2	6,7	6,1	5,4	8,7	8,2	0,93
ИФА анти-К	9,3	9,5	7,5	8,1	7,1	8,7	0,86

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные ИФТС для выявления дифтерийных, столбнячных, коклюшных антител и анти-НВs обеспечивают достаточно высокую степень достоверности результатов иммуноферментного анализа.

Экспериментальные разработки позволили провести исследования в направлении решения ряда практических задач использования предлагаемых ИФТС.

В частности, была проведена оценка возможности использования разработанных тест-систем для контроля иммуногенности комбинированных вакцин по содержанию соответствующих антител в сыворотках крови иммунизированных морских свинок (табл. 8).

Сравнительная оценка эффективности вакцин
в опытах на морских свинках

Вакцина*	Определяемые антитела (средняя геометрическая титра)			
	столбнячные, МЕ/мл	дифтерийные, МЕ/мл	анти-НВs, мМЕ/мл	коклюшные, ИЕ/мл
Бубо-М	7,1 [5,1-9,9]	7,3 [5,7-9,2]	5769,1 [1801,1-18479,4]	отр.
АДС-М	3,5 [1,7-7,2]	4,8 [3,0-7,6]	отр.	отр.
АКДС	7,9 [5,3-11,6]	11,7 [6,2-22,4]	отр.	104,4 [73,2-148,9]
Бубо-Кок	14,0 [10,6-18,3]	12,9 [6,4-25,7]	2661,5 [813,0-8712,3]	73,2 [54,8-97,7]
ВГВ 5 мкг	отр.	отр.	112,4 [50,6-249,6]	отр.
ВГВ 10 мкг	отр.	отр.	343,3 [231,0-510,2]	отр.

* Примечание: Бубо-М – вакцина для профилактики дифтерии, столбняка и гепатита В
АДС-М – вакцина для профилактики дифтерии и столбняка
АКДС – вакцина для профилактики коклюша, дифтерии и столбняка
Бубо-Кок – вакцина для профилактики коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В
ВГВ – вакцина гепатита В

Как видно из представленных данных, в случае использования вакцин Бубо-М и Бубо-Кок по сравнению с АДС-М и АКДС наблюдался более высокий уровень дифтерийных и столбнячных антител. При этом выявлен выраженный потенцирующий эффект как анатоксинов, так и коклюшного компонента на формирование иммунного ответа против НВsAg.

В наблюдениях на детях подтвердился потенцирующий эффект совместного введения антигенов, обнаруженный ранее в опытах на животных (табл. 9).

Сравнительная оценка эффективности вакцин в наблюдениях на детях

Вакцина*	Определяемые антитела (средняя геометрическая титра)			
	столбнячные, МЕ/мл	дифтерийные, МЕ/мл	анти-НВs, мМЕ/мл	коклюшные, ИЕ/мл
Бубо-М	39,1 [31,5-48,4]	19,6 [15,3-25,1]	12557 [6298-25035]	отр.
АДС-М	14,3 [11,3-18,0]	13,5 [10,4-17,5]	отр.	отр.
АКДС	3,4 [2,5-4,5]	1,8 [1,3-2,4]	отр.	66,3 [44,9-97,7]
Бубо-Кок	3,7 [2,8-4,7]	2,5 [1,8-3,4]	453,7 [268,3-766,9]	64,9 [31,5-133,6]

* Примечание: вакцинами Бубо-М и АДС-М привиты дети 6 лет; вакцинами АКДС и Бубо-Кок привиты дети первого года жизни

Таким образом, в экспериментах на животных и наблюдениях на людях была обоснована возможность использования разработанных ИФТС для контроля эффективности иммунизации, при этом тест-системы дают возможность выявлять уровень специфических антител на любой стадии цикла вакцинации, что может служить основанием для определения дальнейшей тактики иммунизации.

Тест-система для определения анти-НВs была успешно применена для обоснования тактики экстренной специфической профилактики гепатита В в эксперименте и наблюдениях на людях (табл.10, 11). При этом было показано, что оптимальной схемой экстренной специфической профилактики является одномоментное введение препарата Антигеп (иммуноглобулин человека против гепатита В) и вакцины гепатита В, обеспечивающее быстрое появление антител в концентрации, значительно превышающей протективную с последующим развитием иммунного ответа на НВsAg.

Таблица 10

Определение концентрации анти-НВs в сыворотках крови
иммунизированных кроликов

Группы *	Средняя геометрическая титра анти-НВs, мМЕ/мл									
	1-3ч	24 ч	72 ч	7 сут	14 сут	21 сут	4 нед	6 нед	8 нед	10 нед
I гр.	40,0 [20,0-80,0]	340,0 [230,0-510,0]	450,0 [350,0-570,0]	160,0 [100,0-250,0]	30,0 [10,0-80,0]	8,5 [2,0-33,0]	0	0	0	0
II гр.	0	0	5,7 [3,0-10,0]	220,0 [10,0-370,0]	780,0 [160,0-3830,0]	180,0 [20,0-1430,0]	190,0 [80,0-420,0]	9750,0 [3130,0-30300,0]	5490,0 [3210,0-9380,0]	120620,0 [51870,0-280490,0]
III гр.	25,0 [16,0-37,0]	240,0 [180,0-320,0]	240,0 [190,0-310,0]	650,0 [130,0-3320,0]	1120,0 [450,0-2780,0]	470,0 [180,0-1220,0]	330,0 [50,0-2030,0]	12010,0 [6490,0-22230,0]	5060,0 [3100,0-8200,0]	75800,0 [33300,0-172500,0]
IV гр.	20,0 [11,0-35,0]	330,0 [50,0-990,0]	300,0 [290,0-780,0]	70,0 [60,0-80,0]	13,0 [0,5-18,0]	5,6 [2,0-7,0]	0	490,0 [240,0-1010,0]	330,0 [270,0-3990,0]	4130,0 [2950,0-5770,0]

* Примечание: схема иммунизации: I - Антигеп 100 МЕ,
II - ВГВ по схеме 0-1-2,
III - ВГВ (I доза) + Антигеп,
IV - «Антигеп», через месяц ВГВ.

Таблица 11

Иммунологическая эффективность разных схем иммунизации детей
закрытых организованных коллективов

Группы*	Средняя геометрическая титра анти-НВs, мМЕ/мл			
	Через 1 месяц после введения 1 дозы препаратов	Через 1 месяц после введения 3 дозы вакцины	Через 1 год после введения 1 дозы препаратов	Через 1 месяц после введения 4 дозы вакцины
I	14,3 [11,7-17,6]	422,7 [169,4-1054,5]	421,6 [55,0-3230,9]	5446,8 [1086,3-27309,8]
II	7,05 [2,2-22,6]	1063,4 [511,7-2209,9]	584,2 [166,8-2045,4]	5451,2 [1451,2-20476,1]
III	1,69 [0,92-3,06]	1586,5 [871,8-2887,1]	280,7 [145,8-540,5]	Не вводилась

* Примечание: схема иммунизации: I – 0 – Антигеп + ВГВ, 1-2-12 мес. – ВГВ;
II – 0- Антигеп, 1-2-3-12 мес. – ВГВ;
III – 0-1-6 мес. – ВГВ.

Далее была исследована возможность применения разработанных ИФТС для определения концентрации специфических антител в препаратах иммуноглобулинов (табл. 12)

Таблица 12

Определение концентрации специфических антител
в препаратах иммуноглобулинов

Иммуноглобулины	Определяемые антитела (СГТ)			
	столбнячные, МЕ/мл	дифтерийные, МЕ/мл	коклюшные, ИЕ/мл	анти-НВs, МЕ/мл
Противостафилококковый	13,6 [10,3-17,9]	7,3 [4,9-11,0]	405,0 [199,1-824,0]	1,5 [1,3-1,8]
Противоэнцефалитный	10,8 [9,5-12,3]	6,2 [4,9-7,9]	335,1 [291,7-384,9]	1,6 [1,4-2,0]
Противостолбнячный	63,8 [53,5-75,8]	12,3 [11,5-13,1]	380,4 [340,2-425,4]	1,5 [1,1-2,0]
Нормальный	12,0 [8,8-16,4]	7,0 [4,8-10,2]	350,1 [259,4-471,8]	1,7 [1,4-2,0]
Антигеп	12,2 [8,8-17,9]	6,7 [6,1-7,2]	354,1 [300,2-417,6]	72,5 [65,2-89,4]

Разработанные ИФТС были успешно использованы также для определения концентрации анти-НВs в сыворотках крови людей, больных гепатитом В при клинических испытаниях препарата Антигеп (ИФА анти-В); диагностики коклюшной инфекции (ИФА анти-К); оценки популяционного иммунитета. При этом основными преимуществами разработанных ИФТС являются автоматизация анализа, стандартизация результатов, исключение субъективизма в интерпретации, и, самое главное, возможность количественной оценки.

В заключение следует отметить, что разработанные ИФТС открывают широкие возможности для проведения массовых эпидемиологических обследований с целью объективной оценки эффективности вакцинации и ревакцинации против дифтерии, столбняка, коклюша и гепатита В, характеристики иммунной структуры населения и групп повышенного риска, а также оценки качества иммунобиологических препаратов.

Выводы

1. Разработан эффективный и технологичный способ получения конъюгатов на основе белка А и HBsAg, меченных биотином.

2. Впервые с применением амплифицирующей системы авидин-биотин разработаны конструкции иммуноферментных тест-систем для определения специфических антител (дифтерийных, столбнячных, коклюшных, анти-HBs) в сыворотках крови, как людей, так и животных.

3. Качество разработанных тест-систем соответствует требованиям ВОЗ, предъявляемым к наборам для иммунологических испытаний, по следующим критериям: линейность и параллелизм, специфичность, чувствительность, точность, сравнение с референс-методами.

4. Научно обоснована возможность использования разработанных иммуноферментных тест-систем в реальной практике для серологического мониторинга за инфекциями, управляемыми средствами иммунопрофилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В), а также для оценки качества профилактических препаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Казьянин А.В. Симультанная экстренная специфическая профилактика в очагах HBV-инфекции / А.В. Казьянин, С.В. Пленкина, Т.В. Вязникова, В.Н. Борисова, Н.С. Гурьянова // Материалы VIII Всероссийского съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. - Т.2. - С. 180-181.

2. Исаева Н.В. Распространенность и эффективность специфической иммунопрофилактики гепатита В среди медицинских работников / Н.В. Исаева, И.В. Фельдблюм, Т.В. Вязникова и др. // Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке: матер. Всерос. науч. конф. – Пермь, 2003. – С. 40-43.

3. Казьянин А.В. Изучение фармакодинамики анти-HBs при разных схемах введения препарата «Антигеп[®]» и вакцины против гепатита В в эксперименте / А.В. Казьянин, Н.В. Ведерникова, Т.В. Вязникова, С.В. Пленкина //

Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке: матер. Всерос. науч. конф. - Пермь, 2003. - С. 86-89.

4. Николаева А.М. Сравнительная оценка отечественной ИФТС и зарубежных тест-систем для выявления антител к HBsAg / А.М. Николаева, В.Н. Борисова, Т.В. Вязникова // Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке: матер. Всерос. науч. конф. – Пермь, 2003. – С. 157-159.

5. Вязникова Т.В. Оценка валидности рабочих характеристик иммуноферментной тест-системы для выявления анти-HBs / Т.В. Вязникова, А.М. Николаева // Актуальные вопросы вакцинно-сывороточного дела в XXI веке: матер. Всерос. науч. конф. – Пермь, 2003. – С. 159-161.

6. Казьянин А.В. Экстренная специфическая профилактика в очагах гепатита В с использованием различных медицинских иммунобиологических препаратов / А.В. Казьянин, С.В. Пленкина, Т.В. Вязникова // Человек и лекарство: сб. тез. докл. XI Рос. национал. конгресса. – М., 2004. - С. 441.

7. Вязникова Т.В. Опыт использования иммуноферментного анализа для оценки противокклюшного иммунитета / Т.В. Вязникова, Е.В. Гореликова // Современная вакцинопрофилактика: проблемы и перспективы развития: матер. науч.-практ. конф. – Пермь, 2005. – С. 18-23.

8. Казьянин А.В. Результаты динамического наблюдения за состоянием поствакцинального иммунитета взрослых и детей, привитых вакциной «Бубо-М» / А.В. Казьянин, А.М. Николаева, Т.В. Вязникова и др. // Современная вакцинопрофилактика: проблемы и перспективы развития: матер. науч.-практ. конф. – Пермь, 2005. – С. 51-57.

9. Вязникова Т.В. Конструирование иммуноферментных тест-систем для определения дифтерийных, столбнячных, коклюшных и анти-HBs антител / Т.В. Вязникова, А.М. Николаева // Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней: матер. Всерос. науч.- практ. конф. – М., 2006. - С.32.

10. Фельдблюм И.В. Оптимизация эпидемиологического надзора и контроля за коклюшной инфекцией / И.В. Фельдблюм, А.М. Николаева, В.Н.

Сперанская, Т.В. Вязникова // Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней: матер. Всерос. науч.- практ. конф. – М., 2006. - С.97-98.

11. Николаева А.М. Использование тест-системы «ИФА анти-В» для определения антител к HBsAg / А.М. Николаева, Т.В. Вязникова, Н.Б. Казьянина // Химия, химическая технология и биотехнология на рубеже тысячелетий: матер. междунар. науч. конф. – Томск, 2006. – Т.2. - С. 409-410.

12. Фельдблюм И.В. Эпидемиологический надзор и контроль за коклюшной инфекцией / И.В. Фельдблюм, Е.В. Гореликова, Т.В. Вязникова и др. // Методические рекомендации. – Пермь, 2006. – 28 с.

13. Вязникова Т.В. Изучение возможности использования иммуноферментного анализа в системе эпиднадзора за инфекциями, управляемыми вакцинопрофилактикой // Пермский медицинский журнал. – 2006. – Т.23, № 5. – С. 78-81.

14. Николаева А.М. Тест-система для определения антител к HBs-антигену и блокатор в тест-системе / А.М. Николаева, А.В. Казьянин, Т.В. Вязникова, В.Н. Борисова, М.В. Буданов, И.А. Яковлева, В.А. Мельников // Патент на изобретение № 2206095 РФ от 10.06.2003 г.

15. Николаева А.М. Тест-система для определения противокклюшных антител в сыворотке крови человека и животных и универсальный конъюгат в тест-системе / А.М. Николаева, Т.В. Вязникова, А.В. Казьянин, В.Н. Сперанская // Приоритетная справка № 2006127549 от 31.07.2006 г.

ВЯЗНИКОВА

Татьяна Владимировна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ
ТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ АВИДИН-БИОТИНОВОГО
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ
(ДИФТЕРИЙНЫХ, СТОЛБНЯЧНЫХ, КОКЛЮШНЫХ, АНТИ-HBS)**

14.00.36 – аллергология и иммунология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Подписано в печать ____ .04.2007 г. Формат 60 x 84 x 16

Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатана в типографии _____, г. Пермь, ул. _____