



УДК 577.112.85+616-097

Синтетичні позитивні контролю імуноферментних наборів для виявлення IgA та IgM антитіл до *Chlamydia trachomatis*

О.Ю. Галкін¹, Ю.В. Горшунів², О.Б. Бесараб¹

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Київ, Україна

²Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, Київ, Україна

Важливе місце серед методів клінічної лабораторної діагностики посідають серологічні методи, основані на виявленні серологічних маркерів інфекційних і неінфекційних захворювань. Найбільш інформативним, універсальним та поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз. Важлива перевага даного методу – можливість виявлення специфічних антитіл різних класів, що дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання. На даному принципі побудована диференційна серологічна діагностика уrogenітального хламідіозу: відразу після інфікування *Chlamydia trachomatis* в організмі відбувається утворення специфічних IgM антитіл, а згодом синтезуються основні проєктивні антитіла класу IgG; при загостренні хронічного уrogenітального хламідіозу в організмі можуть синтезуватися специфічні антитіла класу IgA. Комплексне обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на *Ch. trachomatis* передбачає тестування сироватки (плазми) крові на вміст специфічних антитіл усіх трьох класів. Суттєвою проблемою у виробництві імуноферментних діагностичних наборів є отримання відповідного позитивного контролю. Сироватка (плазма) крові людини з умістом специфічних антитіл певного класу – край дефіцитний матеріал. Запропоновано методологічний підхід щодо застосування синтетичних позитивних контролів імуноферментних наборів для виявлення IgA та IgM антитіл до *Ch. trachomatis*, який полягає у використанні кон'югату нормальних IgM або IgA людини та моноклональних антитіл до основного білка зовнішньої мембрани збудника уrogenітального хламідіозу. Для вирішення проблеми можливо використовувати NHS ефір-малеїмід опосередковану кон'югацію та періодатний метод біокон'югації. Синтетичні позитивні контролю, отримані різними методами, характеризуються вищим титром, на відміну від високотитражних IgM- та IgA-позитивних сироваток. Разом із цим, позитивний контроль, отриманий за допомогою NHS ефір-малеїмід опосередкованої кон'югації характеризується найкращим профілем титрування (меншим спаданням активності в імуноферментному аналізі за його розведення) як на момент його отримання, так і після його зберігання упродовж тижня за температури 37 °C.

Ключові слова: імуноферментний аналіз; позитивний контроль; уrogenітальний хламідіоз; кон'югація

Synthetic positive controls for ELISA test kits for detection of IgA and IgM antibodies to *Chlamydia trachomatis*

O.Y. Galkin¹, Y.V. Gorshunov², O.B. Besarab¹

¹National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, Ukraine

²Research and Technology Institute of Urban Development, Kyiv, Ukraine

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most informative and versatile method of serological diagnostics. The possibility of detecting by ELISA specific antibodies of different classes allow to differentiate primary infectious process and its remission, exacerbation and chronic disease (holding of differential diagnosis). This approach is implemented in the methodology for evaluation of patients for presence of humoral immune response against the causative agent of urogenital chlamydiosis. As with other infections immediately after *Chlamydia*

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», пр. Перемоги, 37, Київ, 03056, Україна
National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute", Peremohy av., 37, Kyiv, 03056, Ukraine
Tel.: +38-067-234-86-42. E-mail: alexfbt@mail.ua

Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства, вул. Урицького, 35, 03035, Київ, Україна
Research and Technology Institute of Urban Development, Urytskogo str., 35, Kyiv, Ukraine
Tel.: +38-044-502-79-00. E-mail: alexfax@mail.ru

trachomatis infection the specific IgM antibodies are formed, and subsequently basic projective antibodies of IgG class are synthesized. However, at exacerbation of chronic urogenital chlamydia specific IgA antibodies can be synthesized. That is why comprehensive evaluation of patients for presence of humoral immune response to *Ch. trachomatis* involves plasma testing of specific antibodies of all three classes. The essential problem in the production of ELISA diagnostic kits is obtaining of positive control. The classic version of positive control is human blood plasma containing specific antibodies. But specific IgM- and IgA-positive sera are deficit raw materials. This fact can significantly limit the production of diagnostic kits, especially in case of large-scale manufacture. We have suggested methodological approach to use of synthetic positive controls in indirect ELISA kits based on conjugate of normal human IgM (IgA) and monoclonal antibodies against major outer membrane protein of *Ch. trachomatis*. It was found that it's possible to realize such task by means of NHS ester-maleimide-mediated conjugation (by sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) and reductive amination-mediated conjugation (by sodium periodate). It was found that synthetic positive controls obtained by different methods are characterized by higher titer compared to IgM- and IgA-positive high-titer serum. However, positive control obtained by NHS ester-mediated maleimide conjugation has the best titration profile characteristics, at the release time and after one-week storage at 37 °C.

Keywords: ELISA; positive control; urogenital chlamydia infection; conjugation

Вступ

Лабораторна діагностика – невід’ємна частина клінічного обстеження пацієнта, адже без даних лабораторного обстеження неможливе не тільки встановлення клінічного діагнозу, а й контроль за ефективністю терапевтичних заходів (Zupanec, 2005). Серед усього комплексу методів клінічної лабораторної діагностики важливе місце посідають серологічні методи, основані на виявленні серологічних маркерів (антигенів, алергенів, антитіл) інфекційних (вірусних, бактеріальних, грибкових і паразитарних) та неінфекційних (у т. ч. аутоімунних, алергічних, ендокринних і онкологічних) захворювань. Найбільш інформативним, універсальним і, як наслідок, поширеним методом серологічних досліджень є імуноферментний аналіз (ІФА) (Galkin, 2014). Можливість виявлення за допомогою ІФА специфічних антитіл різних класів дозволяє диференціювати первинний інфекційний процес і його ремісію, загострення чи хронізацію захворювання, тобто проводити диференціальну діагностику. Такий підхід реалізується у методології обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на збудник уrogenітального хламідіозу *Chlamydia trachomatis* (Taylor-Robinson, 1997; Chernesky, 2005; Isakov et al., 2012; Kamel, 2013). Як і у випадку інших інфекцій, відразу після інфікування *Ch. trachomatis* в організмі відбувається утворення специфічних IgM антитіл, а згодом синтезуються основні проєктивні антитіла класу IgG. Разом із тим при загостренні хронічного уrogenітального хламідіозу в організмі можуть синтезуватися специфічні антитіла класу IgA. Отже, комплексне обстеження пацієнтів на наявність гуморальної імунної відповіді на *Ch. trachomatis* передбачає тестування сироватки (плазми) крові на вміст специфічних антитіл усіх трьох класів (Ossewaarde, 1994; Isakov et al., 2012; Kamel, 2013).

За літературними даними (Ossewaarde, 1994; Kamel, 2013), імуноферментні набори для виявлення специфічних антитіл класу IgM та IgA до *Ch. trachomatis* у сироватці (плазмі) крові людини побудовані за принципом непрямого ІФА. Суттєвою проблемою у виробництві подібного роду діагностичних наборів є отримання позитивного контролю (ПК). Класичний варіант ПК – це сироватка (плазма) крові людини з вмістом специфічних антитіл певного класу. Частота виявлення IgM- та IgA-позитивних сироваток незначна. Вкрай дефіцитний відповідний біологічний матеріал – сировина для отримання ПК. Ця обставина може суттєво

обмежувати виробництво діагностичних наборів, особливо за умов широкомасштабного виробництва. Нами запропоновано методологічний підхід до використання синтетичних ПК в імуноферментних наборах, побудованих за принципом непрямого ІФА, який полягає у використанні кон’югату нормальних імуноглобулінів класу IgM (IgA) та моноклональних антитіл (МкАт) до основного білка зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* (major outer membrane protein, МОМР).

Мета цієї статті – охарактеризувати різні методи біокон’югації для синтезу позитивних контролів для імуноферментних наборів під час виявлення IgA та IgM антитіл до *Ch. trachomatis*.

Матеріал і методи досліджень

NHS ефір-малеїмід опосередкована кон’югація. Синтез кон’югату проводили за допомогою базового методу (Hermanson, 2000) із власними модифікаціями. На першому етапі проводили активацію нормального IgM (IgA) людини (Nikolayenko et al., 2005) NHS ефір-малеїмідним зшивальним агентом – сульфо-сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилату (сульфо-SMCC). Використовували 2–3 мл розчину IgM (IgA) (400–420 мг/мл) у 0,1 М фосфатному буфері із 0,15 М NaCl, pH 7,2 (ФБР). До розчину імуноглобулінів додавали 6 мг сульфо-SMCC, розмішували до повного розчинення та витримували упродовж 30 хв за кімнатної температури. Відділення сульфо-SMCC, що не прореагував, проводили на колонці 2,5 × 100 см із сефакрилом S-300, використовуючи ФБР. Активовані імуноглобуліни елюювали з колонки, розводили до концентрації 20 мг/мл та відразу використовували для синтезу кон’югата.

Кон’югацію активованого нормального імуноглобуліну та МкАт із відновленими сульфгідрильними групами проводили таким чином. Використовували розчин МкАт до МОМР із концентрацією 5 мг/мл у ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. До 3 мл розчину МкАт додавали 18 мг меркаптоетиламіну (МЕА), інкубували 90 хв за температури 37 °C. Для відділення редукованих антитіл від МЕА, що не вступив у реакцію, застосовували хроматографічну колонку 1,5 × 40 см із сефадексом G-25 (Pharmacia Biotech), використовуючи ФБР із 10 ммоль/л ЕДТА. Елюцію редукованих антитіл проводили зі швидкістю 2 мл/хв. Збирали фракції об’ємом 0,5 мл і вимірювали оптичну густину при 280 нм. Зібрані фракції редукованих МкАт негайно змішували з активованими імуноглобулінами (молярне

співвідношення IgM : МкАт становило 1 : 4, а IgA : МкАт – 1 : 2). Реакційну суміш витримували 2 год за кімнатної температури. Отриманий кон'югат піддавали очищенню за допомогою імуноафінної хроматографії на колонці із сефарозою 6-В, на якій іммобілізовані МкАт до МOMP.

Періодатний метод кон'югації. Кон'югацію МкАт до МOMP із нормальним імуноглобуліном людини здійснювали у молярному співвідношенні МкАт до IgM 1 : 1 методом періодатного окислення (Tijssen, 1985) із власними модифікаціями. Для окислення імуноглобулінів людини (15 мг/мл) застосовували 0,1 М бікарбонатний буфер, рН 8,3, додаючи такий же об'єм 14 мМ водного розчину періодату натрію. Суміш інкубували протягом 2 год за кімнатної температури. Одержаний таким чином розчин активованого імуноглобуліну людини додавали до розчину МкАт, які попередньо діалізували проти 0,1 М карбонатного розчину, рН 9,2. Суміш переносили у хроматографічну колонку та додавали 1/3 частину сухого сефадексу G-25, інкубували протягом 3 год за кімнатної температури. По закінченні інкубації розчин кон'югату елюювали з колонки та зупиняли реакцію додаванням 1/20 об'ємної частини водного розчину NaBH₄ (5 мг/мл), залишаючи на 30 хв за кімнатної температури. Після цього ще додавали 3/20 частини розчину боргідриду натрію, інкубували протягом 60 хв. Одержаний розчин кон'югату переводили у 0,02 М фосфатний буфер з 0,15 М NaCl шляхом діалізу.

Непрямий ІФА. Рекombінантний МOMP (Galkin and Dugan, 2014) сорбували в 0,02 М карбонат-бікарбонатному буфері в концентрації 2 мкг/мл на 96-лункові полістеролові планшети для ІФА високої сорбційної ємності (Suzhou Congrem Biomedical Technology Co., Китай). Планшет інкубували протягом 12 год за 4 °С, потім тричі відмивали 0,02 М фосфатним буферним

розчином із 0,15 М NaCl та 0,2% твін-20 (ФБРТ) та витримували у розчині бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (10 мг/мл в ФБР) 1 год за температури 37 °С. Після чотириразового відмивання ФБРТ лунки планшета заповнювали 100 мкл розчину кон'югату нормального IgM (IgA) та МкАт до МOMP у реакційному буферному розчині (0,05 М трис-НСІ буфер, рН 8,0, 0,15 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0,5 мг/мл БСА, 0,2% твін-20). Планшети інкубувалися 30 хв за температури 37 °С та відмивали 4 рази ФСБТ. Після відмивання вносили розчин пероксидазного кон'югату моноклональних антитіл до IgM (IgA) людини (100 мкл/лунку), який інкубували 30 хв за температури 37 °С. Тричі відмивали ФБРТ і двічі дистильованою водою, після чого вносили по 100 мкл субстратно-хромогенної суміші (розчин 3,3',5,5'-тетраметилбензидину 0,25 мг/мл у 0,1 М натрій-цитратного буферу, рН 4,5, із додаванням 10 мкл 33% розчину перекису водню). Реакцію проявляли 20 хв у темноті та зупиняли, додаючи 50 мкл 2 М сірчаної кислоти. Оптичну густину вимірювали за 450 нм/620 нм.

Результати та їх обговорення

Грунтуючись на даних інших авторів (Harlow and Lane, 1988; Johnstone, 1997; Hermanson, 2000) та власному досвіді (Galkin, 2010), ми обрали два принципові методологічні підходи до синтезу кон'югатів формату «антитіло – антитіло», які піддавали оцінці для синтезу відповідного ПК (неспецифічні IgM/IgA + моноклональних антитіл до МOMP): 1) NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація на прикладі сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил) циклогексан-1-карбоксилату (SMCC) як зшивального агента; 2) періодатний метод (відновне амінування) (рис. 1, 2).

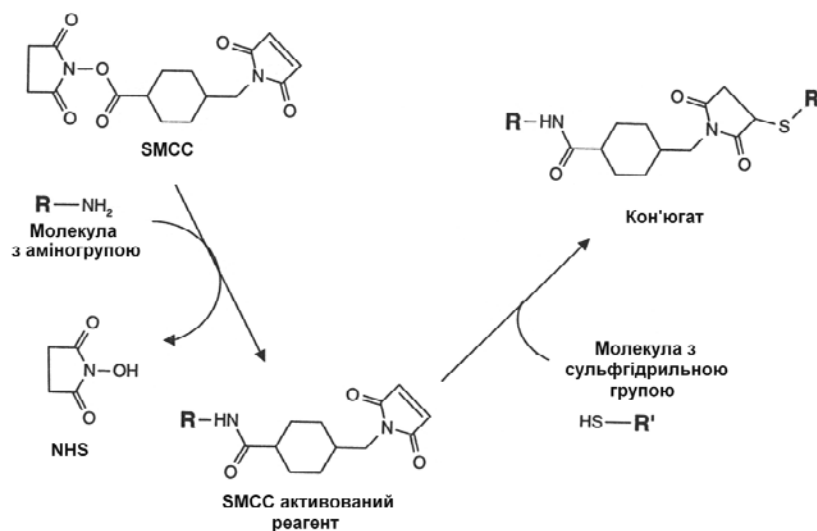


Рис. 1. Схема одержання кон'югатів за допомогою SMCC

Застосування зазначених методологічних прийомів можливе через такі передумови. NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація можлива за участі двох біомолекул, одна з яких має вільні аміногрупи, а друга – вільні сульфгідрильні групи. Очевидно, що й IgM (IgA) людини, й мишачі моноклональні антитіла мають

відповідні групи, які можуть бути задіяні у даній методиці. Потенційна можливість використання періодатного методу зумовлена тим, що молекули IgM та IgA людини містять 7–12% вуглеводних залишків (Filipovich, 1999). Це, у свою чергу, дозволяє проводити модифікацію молекули IgM (IgA) з утворенням

активних альдегідних груп, які згодом будуть реагувати з аміногрупами антитіл з утворенням основи Шиффа. Альдегідні групи у молекулі IgM (IgA) утворюються під час окиснення періодатом натрію їх вуглеводних компонентів, аміногрупи якого попередньо або блоковані 1-фтор-2,4-динітробензолом, або протоновані (Hermanson, 2000). Таким чином, нам слід було на практиці оцінити прийнятність згаданих методик для

синтезу біокон'югатів формату «антитіло – антитіло». Синтетичні ПК, отримані різними методами, оцінювали шляхом їх титрування в імуоферментному аналізі, призначеному для виявлення IgM та IgA антитіл до збудника уrogenітального хламідіозу. Дане дослідження проводили порівняно з титруванням високотитражних сироваток з умістом відповідних специфічних антитіл, а також негативної сироватки (рис. 3).

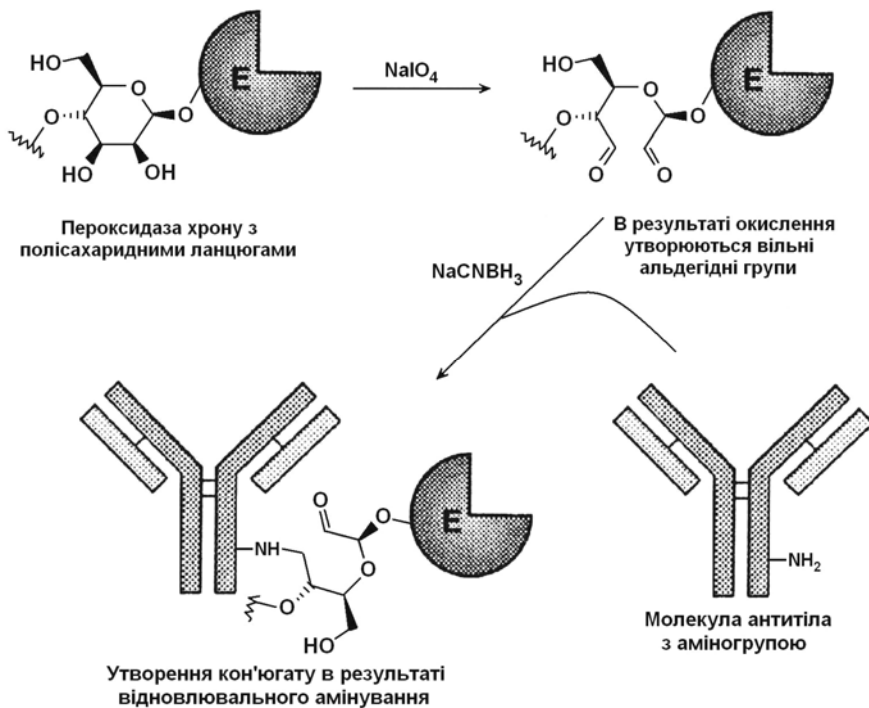


Рис. 2. Періодатний метод одержання кон'югатів

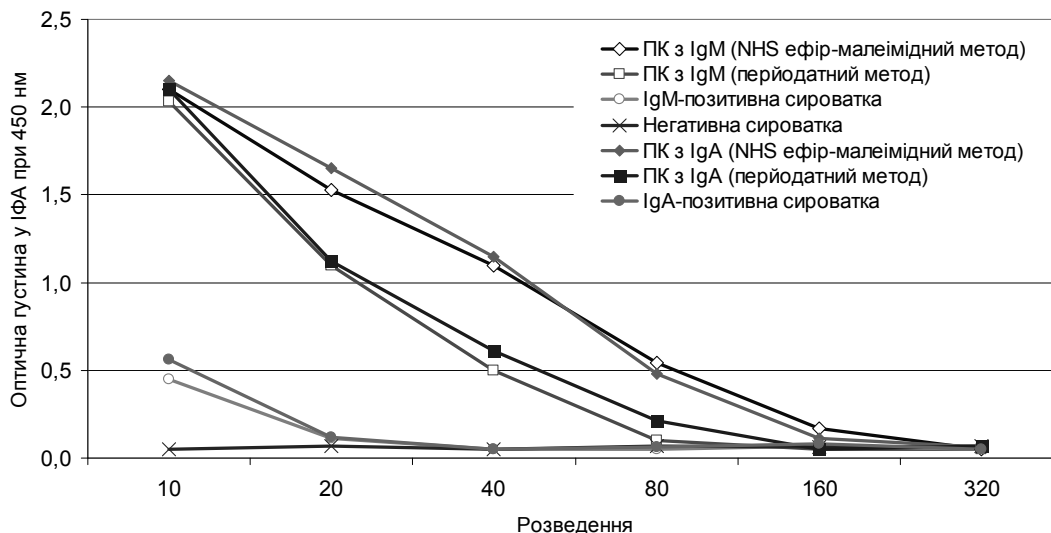


Рис. 3. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами

Найкращим результатом характеризувався ПК, отриманий внаслідок використання SMCC як зшивального агента (NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація). Спадання активності у разі розведення ПК, отриманого періодатним методом, відбувалося інтенсивніше. Разом із цим, усі варіанти синтезованих ПК характеризувалися сприятливішим сигналом у ІФА, аніж високотитражні

IgM- та IgA-позитивні сироватки. Аналогічні дослідження проведено після тесту прискореної стабільності (зберігання упродовж тижня за температури 37 °C). Результати відповідних випробувань (рис. 4) свідчили, що спадання активності синтетичних ПК відбувається менш повільно, ніж позитивних сироваток, що містять відповідні специфічні антитіла.

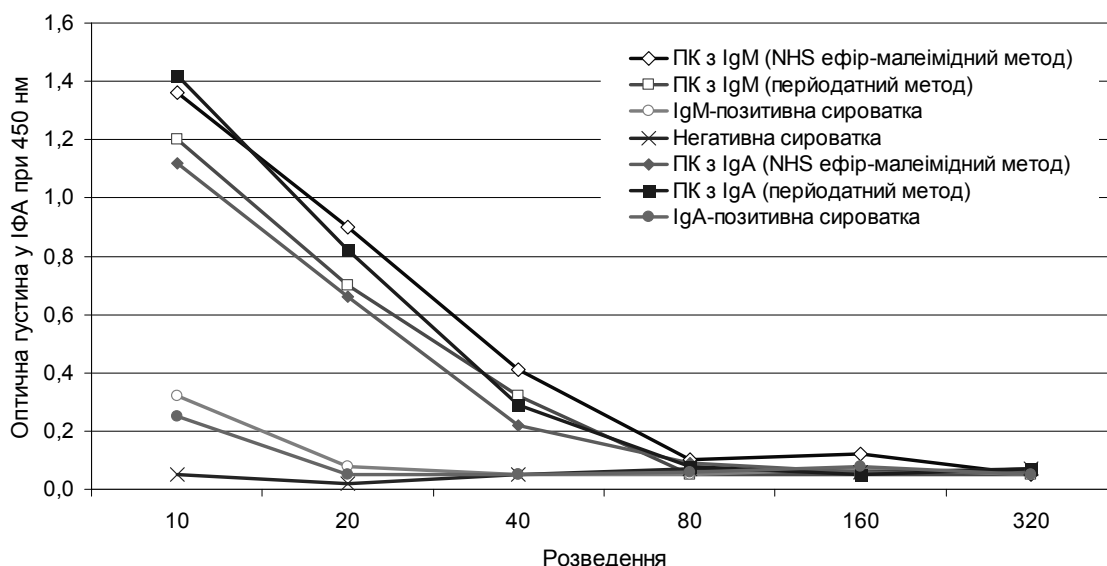


Рис. 4. Титрування синтетичних контролів, отриманих різними методами, після зберігання за 37 °С

Такі результати зумовлюють перспективність застосування описаного методологічного прийому під час розроблення та виготовлення імуноферментних наборів для діагностики уrogenітального хламідіозу. Отримані нами результати корелюють із даними інших праць у частині можливості створення кон'югованих біореагентів, які б характеризувалися кращими характеристиками, зокрема стабільністю та чутливістю (Dhar et al., 2012; Galkin and Gorshunov, 2014).

Висновки

Обґрунтовано методологічні підходи до отримання синтетичних позитивних контролів для непрямого імуноферментного аналізу, призначеного для виявлення IgM та IgA антитіл до збудника уrogenітального хламідіозу: NHS ефір-малеїмід опосередкована кон'югація на прикладі SMCC як зшивального агента, періодатний метод біокон'югації. Синтетичні позитивні контролі, отримані різними методами, характеризуються вищим титром порівняно з високотитражними сироватками, що містять IgM та IgA антитіл до *Ch. trachomatis*. Позитивний контроль, отриманий за допомогою SMCC, характеризується найкращим профілем титрування (меншим спаданням активності у ІФА під час розведення) як на момент отримання, так і після його зберігання за підвищеної температури.

Бібліографічні посилання

Chernesky, M.A., 2005. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 16(1), 39–44.

Dhar, T.K., Dasgupta S., Ray, D., Banerjee, M., 2012. A filtration method for rapid preparation of conjugates for immunoassay. *J. Immunol. Methods.* 385, 71–78.

Filippovich, J.B., 1999. *Osnovy Biohimii [Fundamentals of Biochemistry]*. Agar, Moscow.

Galkin, O.Y., 2010. Approaches to the synthesis of conjugates for enzyme immunoassay test-systems and evaluation of

their use for diagnostics of infectious diseases. *Ukr. J. Clin. Lab. Med.* 5(4), 54–60.

Galkin, O.Y., 2014. Parametry bioanalychnoyi standartyzatsiyi zasobiv dlya serolohichnoyi diahnostryky [Parameters for bioanalytical standardization of medical devices for serological diagnostics]. *Materialy IV Naukovo-Praktychnoyi Konferentsiyi "Suchasni Dosyahnennya Farmatsevtichnoyi Tekhnolohiyi"* [Proc. 4th Sci. Conf. "Recent advances in pharmaceutical technology"]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Ukrainian).

Galkin, O.Y., Dugan, O.M., 2014. Recombinant heat shock protein of *Chlamydia trachomatis*: Perspectives of usage in serological diagnostics. *Materialy Mizhnarodnoyi Naukovoyi Konferentsiyi "Mekhanizmy Funktsionuvannya Fiziolohichnykh System"* [Proc. Sci. Conf. "The Mechanisms of Physiological Systems Functioning"]. Lviv National University, Lviv.

Galkin, O.Y., Gorshunov, Y.V., 2014. Otsinka metodiv biokon'yuhatsiyi dlya otrymannya syntetychnykh pozytyvnykh kontroliv dlya imunof fermentnoho analizu modyfikatsiyi "IgM-pastka" [Evaluation of bio-conjugation methods for obtaining of synthetic positive control for IgM-capture ELISA]. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* 5(2), 85–89.

Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.-Y.

Hermanson, G.T., 2000. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego.

Isakov, V.A., Kuljashova, L.B., Berezina, L.A., Svarval', A.V., 2012. Laboratornaja diagnostika urogenital'nogo hlamidioza. *Sovremennye metody diagnostiki hlamidijnoj infekcii (analiticheskij obzor)* [Laboratory diagnosis of urogenital chlamydia. Modern methods of diagnosis of chlamydia infection (analytical review)]. *Terra Medica* 27, 8–13 (in Russian).

Johnstone, A., 1997. *Immunochemistry 2: A practical approach*. IRL Press, Oxford.

Kamel, R.M., 2013. Screening for *Chlamydia trachomatis* infection among infertile women in Saudi Arabia. *Int. J. Womens Health* 5, 277–284.

Nikolayenko, I.V., Galkin, O.Y., Grabchenko, N.I., Spivak, M.Y., 2005. Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica Bioorganica Acta* 3(2), 3–11.

- Ossewaarde, J.M., de Vries, A., van den Hoek J.A., van Loon, A.M., 1994. Enzyme immunoassay with enhanced specificity for detection of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.* 32(6), 1419–1426.
- Taylor-Robinson, D., 1997. Evaluation and comparison of tests to diagnose *Chlamydia trachomatis* genital infections. *Hum. Reprod.* 12(11), 113–120.
- Tijssen, P., 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. *Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* 15, 674–678.
- Zupanec, I.A., Misjureva, S.V., Propisnova, V.V., 2005. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: Metody issledovanija* [Clinical laboratory diagnostics: Research methods]. Publishing House of the National University of Pharmacy, Kharkov (in Russian).

Надійшла до редколегії 11.01.2015