

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Беньковська Л. К.

УДК 617-07+616. 36-002

Беньковська Л. К.

КОРЕКЦІЯ НЕСПЕЦИФІЧНИХ РЕАКЦІЙ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ (НА МОДЕЛІ ГЕПАТИТУ С)

Державна наукова установа «Науково-практичний центр

профілактичної та клінічної медицини ДУС України»

(м. Київ)

Зв'язок роботи з науковими програмами та планами. Робота виконувалась в межах заочної аспірантури та підготовки дисертації за темою «Вплив антигенної мімікрії на ефективність серологічної діагностики гепатиту С» на базі ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України» у рамках наукової тематики лабораторії епідеміології парентеральних вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції «Приховані форми гепатитів В і С у донорів крові та їх епідеміологічне значення» (№ держ. реєстрації 011U000049) та лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій «Молекулярні основи конструювання профілактичних та лікувальних антивірусних препаратів» (№ держ. реєстрації 011U002004).

Вступ. З моменту виявлення збудника і до цього часу гепатит С (ГС) залишається однією з найактуальніших проблем в інфектології. Вірусом гепатиту С (HCV), за оцінками вчених, інфіковано близько 3% населення земної кулі, і фактично, мова йде про пандемію, яка за масштабом і кількістю інфікованих осіб в 5 разів перевищує розповсюдження ВІЛ-інфекції [1]. Щорічно 3-4 млн. осіб заражуються HCV і більше 350000 помирають від уражень печінки, етіологічно обумовлених цим вірусом [6, 10, 13, 15].

Характерною особливістю ГС є тривалий період (5-10-20 років) між гострим гепатитом, який у більшості випадків, перебігає з мінімальною симптоматикою, і розвитком клінічно маніфестованого хронічного гепатиту, котрий, фактично, є основною клінічною формою цього захворювання. Тому вкрай важливою є рання специфічна діагностика HCV-інфекції.

На сьогодні в лабораторній практиці для специфічної діагностики на першому етапі дослідження визначають сумарні антитіла проти HCV (анти-HCV) класів IgG і IgM або тільки класу IgM методом імуноферментного аналізу (ІФА) [5]. Попри високі показники чутливості і специфічності ІФА, не виключена можливість отримання хибних результатів тестування, зокрема, хибно-позитивних, що суттєво знижує точність специфічної діагностики ГС. Головним чинником хибно-позитивних результатів вважають неспецифічне зв'язування імуноглобулінів

сироватки крові з компонентами імуносорбенту тест-систем, і частота таких неспецифічних результатів може коливатися у широких межах, залежно від груп обстежуваних осіб, стану їх здоров'я, імунної системи тощо. Останніми роками як один з можливих чинників хибних результатів тестування на маркери інфекційних хвороб розглядають молекулярну (антигенну) мімікрію – феномен, що полягає у тотожності антигенної структури клітин різних видів за рахунок гомологічних амінокислотних ділянок або конформаційної будови антигенів [7,8].

Роботами С. Л. Рибалко та співавторів було доведено, що мікроорганізми здатні продукувати речовини, антигенно подібні як між собою, так і з пептидами деяких вірусів. Було встановлено, що однією із властивостей вуглеводомісних біополімерів, виділених з культурального середовища при вирощуванні мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Neisseria meningitidis*, *Bacillus subtilis*, *Candida Albicans*, *Micobacterium tuberculosis* та ін.) є антигenna мімікрія з пептидами вірусів і бактерій. Автори назвали отримані та охарактеризовані речовини «мімікринами» [14].

Вважають, що антигенні детермінанти мікроорганізмів можуть нагадувати аналогічні структури людини, як один із механізмів уникнення імунної відповіді організму хазяїна. Стосовно ГС, цей феномен здебільшого розглядають у плані патогенезу інфекції, аутоімунних позапечінкових уражень. Але з'являється все більше повідомлень щодо впливу антигенної мімікрії також і на специфічність серологічних досліджень, зокрема, при виявленні антитіл та РНК HCV в осіб із супутньою патологією [9, 11, 12]. Нашиими попередніми дослідженнями було показано, що при визначенні взаємодії сироваток крові з хибно-позитивними результатами тестування на анти-HCV методом ІФА із мімікринами *S. aureus*, *M. tuberculosis* та *C. albicans*, більшість з них реагували із зазначеними мімікринами, на відміну від сироваток крові здорових донорів, серонегативних щодо маркерів інфікування HCV, ВІЛ та вірусу гепатиту В. Висока частота перехресних реакцій в ІФА з мімікринами (57,7-80,8%) не включає ролі останніх у зниженні специфічності результатів тестування на анти-HCV [2].

Мета роботи – опрацювати можливий спосіб зняття неспецифічної реакції ІФА, на моделі визначення антитіл до HCV, за допомогою антисироваток до мімікринів *St. aureus*, *C. albicans*, *M. tuberculosis*.

Об'єкт і методи дослідження. Сироватки. Зразки сироваток крові, отриманих від пацієнтів, які знаходяться на диспансерному обліку в амбулаторно-поліклінічному відділенні, які після проведення первинних і підтверджувальних досліджень на наявність анти-HCV були розцінені як хибно-позитивні ($n=23$).

Мімікрини (продукти метаболізму мікроорганізмів, виділені з культурального середовища після вирощування *S. aureus*, *M. tuberculosis* та *C. albicans* на 5 добу культивування) отримували трикратним осадженням етанолом з подальшим кип'ятінням розчиненого осаду протягом 10 хв. [3] Очистка мімікринів гельфільтрацією на сефадексі G-50. Зразок препаратору наносили на колонку з сефадексом G-50 (2x30 см), попередньо врівноважену фосфатним буфером, збирали фракції по 0,5 мл і аналізували вміст білків біуретовим методом.

Для визначення взаємодії антитіл у складі хибно-позитивних сироваток з мімікринами в лунки планшетів для ІФА (Maxisorp, «Nunc», Данія) вносили досліджувані мімікрини по 2 мкг/мл в карбонатному буфері (рН 9,6), після чого дотримувались загально визнаного алгоритму проведення аналізу. Оптичну густину (ОГ) зразків хибно-позитивних сироваток реєстрували у двохвильовому режимі (450/630нм); результати ІФА оцінювали за коефіцієнтом позитивності (КП) – співвідношення ОГ досліджуваного зразка до ОГ відсікаючого рівня (cut off). При значенні КП ≥ 1 результат вважали позитивним.

Для отримання антитіл проти мімікринів *St. aureus*, *C. albicans*, *M. tuberculosis* були проімунізовані кролі, породи Шиншила вагою 1,5-2 кг. Розчини мімікринів кролям вводили в третє віко. Наявність специфічних до мімікринів антитіл визначали через 1 місяць після імунізації. Якщо в ІФА сироватки крові кроля реагували з мімікринами у розведенні, меншому за 1:100, проводили повторну імунізацію, використовуючи неповний ад'ювант Фрейнда, і через 1 тиждень повторювали дослідження [3].

Результати дослідження та їх обговорення. Для доказу участі мімікринів у виникненні хибно-позитивних реакцій (ХПР) при виявленні анти-HCV було проведено дослідження ІФА з отриманими хибно-позитивними сироватками (ХПС) з додаванням мімікринів зі *St. aureus*, *C. albicans* та *M. tuberculosis* до розчину для розведення сироваток. Алгоритм дослідження полягав у наступному: до однієї лунки стрипу планшету для ІФА вносили 100 мкл позитивного контрольного зразку, в 2 лунки – по 100 мкл негативного контрольного зразку, в інші – по 30 мкл блок-розчину і по 70 мкл досліджуваних зразків сироваток + 20 мкл розчинів мімікринів. В подальшому

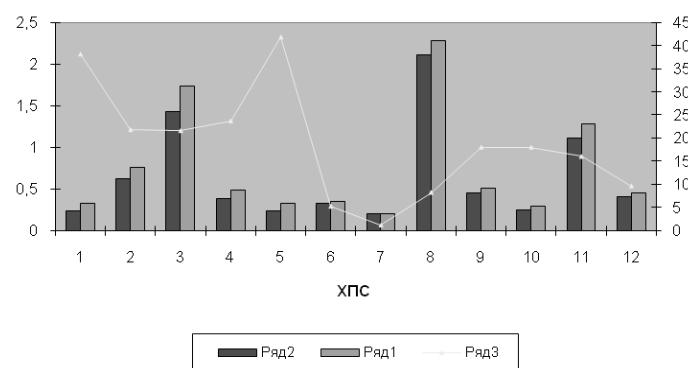


Рис. 1. Вплив мімікринів із *St. aureus* на значення ОГ зразків хибно-позитивних сироваток*.

* Примітка: ряд 1 – ОГ зразків сироваток з додаванням мімікрину; ряд 2 – ОГ зразків сироваток без додавання мімікрину; ряд 3 – відсоток збільшення оптичного сигналу.

дослідження проводили у загально прийнятому порядку. З мімікрином *St. aureus* досліджували 12 сироваток, *C. albicans*, *M. tuberculosis* – по 5 сироваток у повторах.

Результат ІФА оцінювали за середньою величиною ОГ досліджуваних зразків та відсотком збільшення/зменшення величини оптичного сигналу. Встановлено, що додавання мімікринів з *St. aureus* до реакційної суміші підвищило значення ОГ сироваток з ХПР первинного ІФА в середньому на 21% – від 5,2 до 41,9% (рис. 1).

Аналогічні результати щодо підвищення оптичного сигналу ми отримали при додаванні до розчину для розведення сироваток мімікринів з *C. albicans* – в середньому на 12,2% – від 4,2 до 21%. Додавання мімікринів з *M. tuberculosis* мали неоднозначні результати: в двох сироватках з ХПР (№№ 1, 5) значення ОГ були зниженими на 5,3 і 3,8%, відповідно, а в сироватках №№ 2, 3 та 4, навпаки, спостерігалось підвищення величини ОГ від 1,6 до 4% – в середньому на 2,95%. Результати представлені на рисунках 2 і 3.

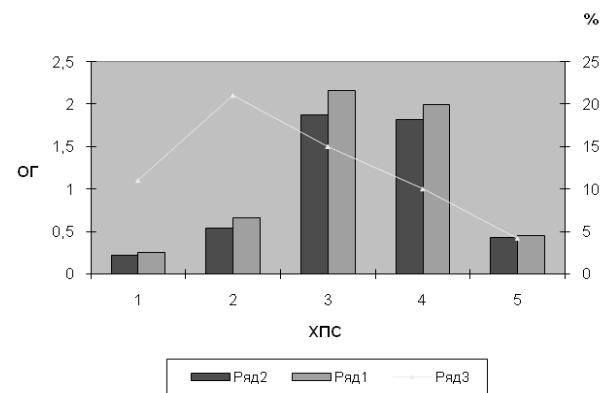


Рис. 2. Вплив мімікринів із *C. albicans* на значення ОГ зразків хибно-позитивних сироваток*.

* Примітка: Ряд 1 – ОГ зразків сироваток з додаванням мімікрину; ряд 2 – ОГ зразків сироваток без додавання мімікрину; ряд 3 – відсоток збільшення оптичного сигналу.

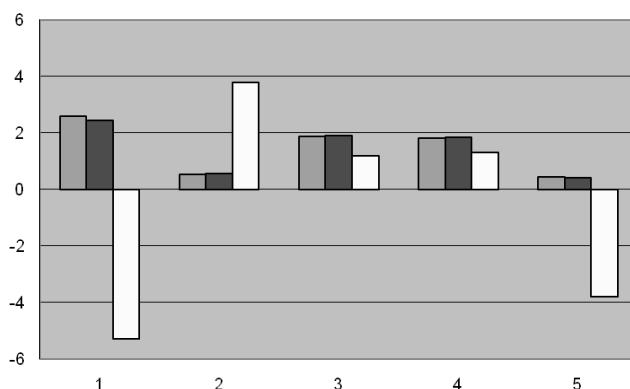


Рис. 3. Вплив мімікринів із *M. tuberculosis* на значення ОГ зразків хибно-позитивних сироваток*

* **Примітка:** Ряд 1 – ОГ зразків сироваток з додаванням мімікрину; ряд 2 – ОГ зразків сироваток без додавання мімікрину; ряд 3 – відсоток збільшення або зменшення оптичного сигналу.

Таким чином, отриманий результат підтверджив можливу участь мімікринів у виникненні ХПР при тестуванні на анти-HCV методом ІФА, а надлишок мімікринів у блок-розчині призвів до підвищення значення оптичного сигналу ІФА при дослідженні ХПС.

Наступний етап роботи полягав у спробі зниження оптичного сигналу ІФА шляхом додавання до суміші реакційних компонентів антитіл до мімікринів.

Антитіла ми отримали після імунізації кролів, як описано у матеріалах і методах. Титр отриманих антитіл визначали в ІФА на планшетах з сорбованими в лунках мімікринами з *St. aureus*, *C. albicans* і *M. tuberculosis* у сироватках кролів, розведених від 1:10 до 1:1280 (рис. 4).

Встановлено, що отримані сироватки кролів, імунізованих мімікринами з *St. aureus* та *C. albicans* взаємодіяли зі своїми мімікринами практично однаково до розведення 1:1280. Натомість сироватка кроля, імунізованого розчином з *M. tuberculosis*, слабко взаємодіяла з відповідними мімікринами, тому в подальшому її не використовували.

На відміну від попереднього досліду, замість блокуючого розчину для можливо-го зменшення перехресного зв'язування антитіл додавали анти-мімікринові сироватки. Для цього в лунки стрипу планшету вносили по 30 мкл сироватки крові імунізованого розчином мімікринів кроля, а потім – по 70 мкл досліджуваних зразків ХПС. Далі дослідження проводили згідно інструкції тест-систем ІФА.

Встановлено, що використання для розведення досліджуваних зразків сироватки кроля з високими титрами антитіл проти мімікрину з *C. albicans* сприяло зменшенню показника ОГ при визначенні анти-HCV

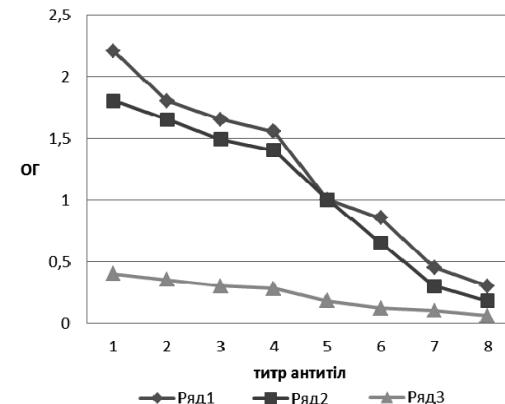


Рис. 4. Результати титрування антитіл до мімікринів у сироватці крові кроля, імунізованого розчином *St. aureus* (ряд 1), *C. albicans* (ряд 2), з *M. tuberculosis* (ряд 3).

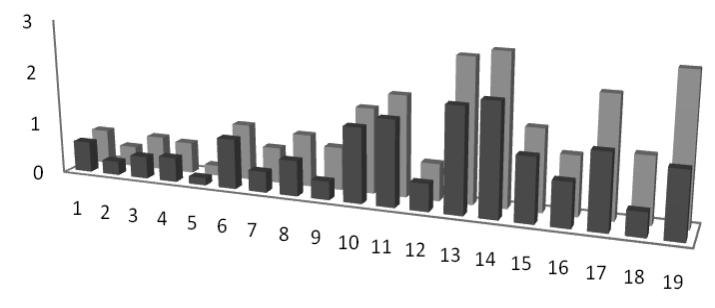


Рис. 5. Зняття неспецифічного зв'язування перехресно-реагуючих антитіл в ХПС з антитілами проти мімікрину з *C. albicans*.

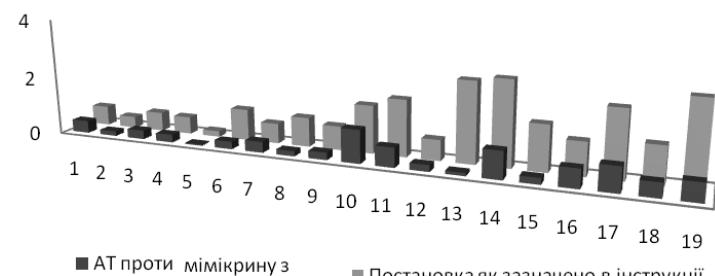


Рис. 6. Зняття неспецифічного зв'язування перехресно реагуючих антитіл в ХПС з антитілами проти мімікрину з *St. aureus*.

в середньому на 30,0 % (від 10,4 до 63,5 %), що свідчило про деяке зняття неспецифичної взаємодії (рис. 5).

Аналогічні результати щодо зняття неспецифічного зв'язування перехресно-реагуючих антитіл були отримані при проведенні дослідження з антитілами до мімікрину з *St. aureus* як блокатора (рис. 6). Аналіз величини зниження неспецифічного сигналу засвідчив, що у цьому досліді показники ОГ знизились ще більше, ніж у попередньому – в середньому на 63,7 % (від 30,7 до 96,15 %). Таким чином, у даному випадку також було доведено зняття неспецифічного зв'язування перехресно-реагуючих антитіл в сироватках, що мали ХПР при виявленні анти-HCV за використання імунних щодо мімікрину з *St. aureus* сироваток.

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

Кроляча сироватка, імунна до мімікрину з *C. albicans* у розведенні 1:1280, проти свого антигену в ІФА взаємодіяла слабше, ніж анти-мімікринова сироватка проти мімікрину з *St. aureus*. Найбільший відсоток зниження оптичного сигналу в ІФА, отриманий при додаванні до досліджуваних сироваток антитіл до мімікрину з *St. aureus*, дозволяє припустити, що саме ці мімікрини відіграють більшу роль у зменшенні специфічності досліджень щодо виявлення анти-HCV[4].

Незважаючи на те, що представлені результати мають попередній характер, вважаємо, що мімікрини з мікроорганізмів, котрі широко представлені в оточуючому середовищі (зокрема, *St. aureus*, *C. albicans*, *M. tuberculosis*), впливають на зниження специфічності досліджень з виявлення антитіл до збудників інфекційних хвороб (зокрема, анти-HCV) методом ІФА. Доказом участі мімікринів в отриманні ХПР при серологічній діагностиці ГС явилось те, що додавання анти-мімікринових антитіл, як блокаторів неспецифічного зв'язування, сприяло інгібіції

взаємодії неспецифічних антитіл з білками HCV, в той час як додавання мімікринів в розчин для розведення сироваток збільшувало оптичний сигнал.

Таким чином можна зробити наступні **висновки**:

1. Антигenna мімікрія впливає на виникнення неспецифічних результатів ІФА при виявленні антитіл до HCV, що підтверджується підвищеннем оптичного сигналу. З-поміж аналізованих мімікринів найбільше значення в отриманні хибно-позитивних результатів ІФА мали мімікрини з *St. aureus*.

2. Неспецифічну взаємодію антитіл у складі сироваток з ХПР частково можна зменшувати за рахунок блокування сайтів зв'язування антитіл з білками HCV шляхом додавання до реакційної суміші анти-мімікринових антитіл.

Перспективи подальших досліджень. На нашу думку, результати проведених досліджень свідчать про перспективу запропонованого підходу у підвищенні специфічності серологічної діагностики методом ІФА, що потребує подальших ґрунтовних науково-практичних розробок.

Література

1. Апросина З. Г. Особенности течения хронического гепатита С / З. Г. Апросина, В. В. Серов // Тер. арх. – 1995. – № 5. – С. 77–80.
2. Беньковська Л. К. Молекулярна мімікрія та її можлива роль у виникненні хибних результатів тестування на анти-hcv / Л. К. Беньковська, Н. В. Іванська, Т. А. Сергеєва // Biopolymers and Cell. – 2013. – Vol. 29, № 5. – P. 406–412.
3. Іванська Н. В. Значення антигенної мімікрії в серологічній діагностиці ВІЛ-інфекції : дис.. доктора мед. наук: 03.00.06 / Іванська Н. В. – К., 2010. – 360 с.
4. Іванська Н. В. Пат. 91677 UA МПК A61 39/42(2006.01) Способ зняття неспецифічного зв'язування антитіл при серологічній діагностиці ВІЛ-інфекції та гепатиту / Н. В. Іванська, С. Л. Рибалко, Л. К. Беньковська. – С/Опубл. 10. 072014.
5. Михайлов М. И. Лабораторная диагностика гепатита С (серологические маркеры и методы их выявления) / М. И. Михайлов // Вирусные гепатиты: достижения и перспективы. – 2001. – № 2. – С. 8-18.
6. Серов В. В. Хронический вирусный гепатит – одна из наиболее важных проблем современной медицины / В. В. Серов, З. Г. Апросина, П. Е. Крель [и др.] // Архив патологии. – 1989. – № 2. – С. 3-9.
7. Boshchenko Y. A. Sources of heterogeneity and “antigenic mimicry” among pathogenic organisms (review of literature and own data) / Y. A. Boshchenko, O. A. Yurchenko, G. S. Skripchenko // J. Acad. Med. Sci. Ukraine. – 2004. – Vol. 10, № 3. – P. 446–243.
8. Damian R. T. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences / R. T. Damian // Amer. Nat. – 1964. – Vol. 98, № 900. – P. 129-149.
9. Fenwick F. Immunohistochemical assessment of hepatitis C virus antigen in cholestatic hepatitis after liver transplantation / F. Fenwick, M. F. Bassendine, I. K. Agarwa [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2006. – Vol. 59, № 2. – P. 174–178.
10. Grammaticos A. P. Hepatitis C virus infection / A. P. Grammaticos // Scr. sci. med. – 2005. – Vol. 37. – P. 25-32.
11. Gregorio G. V. Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection / G. V. Gregorio, K. Choudhuri, Y. Me [et al.] // Clin. Exp. Immuno. I June. – 2003. – Vol. 133, № 3. – P. 404-413.
12. Hu Y. – W. Immunoglobulin mimicry by Hepatitis C Virus envelope protein E2 / Y. -W. Hu, L. Rocheleau, B. Larke [et al.] // Virology. – 2005. – Vol. 332, № 2. – P. 538-549.
13. Lauer G. M. Hepatitis C Virus Infection / G. M. Lauer, D. B. Walker // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345. – P. 41-52.
14. Rybalko S. L. Study of an antigenic similarity between the carbohydrate-containing biopolymers of bacteria and the some viruses' peptides / S. L. Rybalko, O. V. Maksimenok, M. L. Khrostova [et al.] // The bases of the molecular-genetic sanitation of people and environment. International forum 31 May – 1 June 2005, Kyiv. – 2005. – P. 179-182.
15. WHO, Factsheet No 164, July 2012. <http://goo.gl/5m3sY>.

УДК 617-07+616. 36-002

КОРЕКЦІЯ НЕСПЕЦІФІЧНИХ РЕАКЦІЙ СЕРОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ (НА МОДЕЛІ ГЕПАТИТУ С)
Беньковська Л. К.

Резюме. Представлені результати можливого впливу мімікринів на отримання хибно-позитивних результатів при серологічній діагностиці. Розглянуто спосіб підвищення точності діагностики гепатиту С методом ІФА шляхом зниження неспецифічного оптичного сигналу з використанням антитіл кроля до мімікринів *St. aureus*, *C. albicans* та *M. tuberculosis*. Обґрунтована необхідність проведення досліджень які сприяють підвищенню специфічності серологічної діагностики і зменшенню хибних результатів при скринінгових дослідженнях методом ІФА.

Ключові слова: гепатит С, специфічна діагностика, хибно-позитивні результати.

КЛІНІЧНА ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

УДК 617-07+616. 36-002

КОРРЕКЦІЯ НЕСПЕЦИФІЧЕСКИХ РЕАКЦІЙ СЕРОЛОГІЧЕСКОЇ ДІАГНОСТИКИ (НА МОДЕЛІ ГЕПАТИТА С)

Беньковська Л. К.

Резюме. Представлены результаты возможного влияния мимикринов на получение ложноположительных результатов при серологической диагностике. Рассмотрен способ повышения точности диагностики гепатита С методом ИФА путем снижения неспецифического оптического сигнала с использованием антител кролика к мимикринам St. aureus, C. albicans и M. tuberculosis. Обоснована необходимость проведения исследований способствующих повышению специфичности серологической диагностики и уменьшению ложных результатов при скрининговых исследованиях методом ИФА.

Ключові слова: гепатит С, специфическая диагностика, ложноположительные результаты.

UDC 617-07+616. 36-002

Correction of Nonspecific Reactions of Serological Diagnostics (On Hepatitis Model C)

Benkovskaya L. K.

Abstract. The article presents evidence of mimicrins participation in false-positive reactions in the detection of anti-HCV. Microorganisms are capable of producing substances, that are antigenically similar, both among themselves and with some virus peptides. It was found that one of the properties of carbohydrates- containing biopolymers isolated from the culture medium during microorganisms cultivation is antigenic mimicry with peptides of viruses and bacteria. The authors named them as "*mimicrins*"

When add *St. aureus* mimicrins to block-solution, the optical density (OD) of false-positive sera increased by an average of 21% (from 5,2 to 41,9%); when add *C. albicans* mimicrins to solution for sera dilution, the similar results were obtained – increase the optical signal by an average of 12,2% (from 4,2 to 21%). Analysis of the data concerned adding *M. tuberculosis* mimicrins revealed, that OD of two of the five false-positive sera decreased by 5,3 and 3,8%, respectively, and OD of the other three sera contrary increased by an average of 2,95% (from 1,6 to 4%). The presented information confirmed, that mimicrins could participate in false-positive reactions when anti-HCV screening.

On the next the mixture of reaction components of antibodies to *St. aureus*, *C. albicans* and *M. tuberculosis* mimicrins was added to ELISA in order to decrease the optical signal; the antibodies were obtained after rabbits' immunization. The presence of specific antibodies to mimicrins was measured 1 month after immunization. If the ELISA serum of rabbits reacted with mimicrins in dilution of less than 1: 100, a second immunization was performed and repeated after 1 week of the study. The titer of obtained antibodies was determined in ELISA on plates with sorbed in holes mimicrins.

These data showed, that the sera of rabbits, immunized with *St. aureus* and *C. albicans* mimicrins, interacted with their mimicrins almost identically to the dilution of 1: 1280, as opposed to serum of rabbit, immunized with *M. tuberculosis* solution, which weakly interacted with the appropriate mimicrines; this last serum further had not been used in the experiments.

At that stage of the study anti-mimicrine rabbit sera, instead of blocking solution, was added for possible reduction of antibody cross-linking.

It was found, that add of serum with high titers of *C. albicans* mimicrins antibodies contributed to the decrease of OD in the determination of anti-HCV by an average of 30,0% (from 10,4 to 63,5%). When adding rabbit serum with antibodies to *St. aureus* mimicrin as a blocker the OD decreased by an average of 63,7% (from 30,7 to 96,15%). Thus in both studies it has been shown the removal of non-specific binding of cross-reacting antibodies in sera, that had false-positive reactions in detecting anti-HCV. The decreasing of OD by different sera varied. The rabbit serum, immune to *C. albicans* mimicrine in a dilution of 1: 1280, interacted with its antigen in ELISA weaker, than serum with antibodies to *St. aureus* mimicrins. This suggests that *St. aureus* mimicrins, probably, to a greater extent reduce the specificity of ELISA in detecting of anti-HCV.

In our opinion, the results of the research show the perspective of the proposed approach in improving the specificity of serological diagnosis, because mimicrins of the microorganisms, which are widespread in the environment, can affect the accuracy of ELISA, which was demonstrated by the detection of antibodies to HCV.

Keywords: hepatitis C, serological diagnostics, false-positive results, mimicrins.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 20. 08. 2014 р.