

УДК 578.826:543.45:57.083.3

Н.В. Нестерова¹, С.Л. Рыбалко²,
Л.Н. Носач¹, О.Ю. Повница¹,
С.Д. Загородняя¹, Г.В. Баранова¹,
А.В. Головань¹

ЛАБОРАТОРНО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ИММУНОСЕНСОРНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К АДЕНОВИРУСАМ ЧЕЛОВЕКА

¹ Институт микробиологии и вирусологии
имени Д.К. Заболотного НАН Украины, г. Киев;

² Институт эпидемиологии и инфекционных
болезней имени Л.В. Громашевского
АМН Украины, г. Киев

Вирусы играют значительную роль в патологии человека, вызывая тяжелые инфекционные заболевания. Отсутствие своевременной надлежащей специфической диагностики, а также значительное ухудшение экологической ситуации способствует их широкому распространению и тяжелому течению болезней. Важным условием, обеспечивающим успешную терапию является правильный этиологический диагноз вирусного заболевания, поскольку часто подобные клинические проявления могут быть вызваны разными вирусами и требуют разной тактики лечения. Современный уровень развития молекулярной биологии в сочетании с достижениями физики и химии определили новое направление в диагностике — использование иммуносенсорных тест-систем на химической и оптической основе. Биосенсоры на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (ППР), принадлежащие к классу оптических, позволяют регистрировать комплекс макромолекул с высочайшей чувствительностью (до 10–12 моль/л). Практической реализации потенциалов метода ППР способствовало создание в 1990 году первого прибора (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). В Украине разработкой подобных приборов занимается Институт физики полупроводников НАН Украины.

Аденовирусы формируют большое семейство ДНК-содержащих вирусов, выделенных от человека, животных и птиц [1]. Более 50 серотипов аденовирусов человека вызывают различные по клиническим проявлениям респираторные, глаз-

ные, кишечные заболевания. Тяжелые формы заболеваний отмечают у детей младшего возраста, лиц с иммунодефицитным состоянием, реципиентов после пересадки внутренних органов, стволовых клеток, костного мозга и онкобольных [9, 12, 13]. Для диагностики аденовирусных инфекций используют вирусологический метод, метод флюоресцирующий антител (МФА), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразную цепную реакцию. У нас в стране диагностикумы для детекции Ад-инфекции не выпускаются, а диагностика осуществляется в основном МФА с использованием дорогостоящих реагентов. Поэтому создание простого экспресс-диагностикума, который мог бы выявлять Ад-инфекцию, вызванную различными серотипами аденовирусов человека, остается актуальной.

Возможность применения биосенсоров для выявления различных специфических антивирусных антител в сыворотках крови человека подтверждается многочисленными публикациями [2, 5, 6, 8, 10, 11].

Целью настоящей работы было создание биочипов на основе мажорного структурного белка — гексона аденовируса человека серотипа 2 (Ад2) для диагностики специфических антител в сыворотках крови больных методом ППР и проведение лабораторно-экспериментальных испытаний иммуносенсорной тест-системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для иммобилизации на поверхности сенсора как антиген использовали гексон Ад2, очищенный в градиенте плотности хлористого цезия Ад2 и деградированный в щелочной среде. Концентрацию протеина определяли спектрофотометрически, присутствие инфекционных вирионов — по способности к образованию в ядрах инфицированных клеток характерных ДНК-содержащих включений, антигенную активность в реакции иммунодиффузии (РИД) в агарозном геле. Гексон с титром в РИД 1:32–1:64 был получен методом гель-фильтрации на колонке 4В сефарозы, как описано ранее [4]. В лабораторно-экспериментальных испытаниях были использованы панели сывороток крови больных с острыми и хроническими респираторными инфекциями, которые были предоставлены ООО

“ДНК-лаборатория” г. Киев, а также другими клиниками г. Киева. Сыворотки от здоровых доноров предоставлены из Станции переливания крови г. Киев.

Иммуноферментный анализ. В работе был использован непрямой твердофазный ИФА, методика проведения анализа описана ранее [3].

Приготовление биочипов. Стекланные пластинки с золотым напылением промывали дистиллированной водой и очищали смесью, которая содержала дистиллированную воду, 35% перекись водорода и 37% серную кислоту в соотношении 5:1:1. Затем чипы трижды промывали дистиллированной водой и наносили раствор (2мг/мл) декстрана 17000 (Sigma, США) в 0,05% цитратном буфере, pH 5,0–5,2, выдерживали 5 час при комнатной температуре (КТ) (20–25°C). Промывали стекла цитратным буфером (три раза) и наносили вирусный антиген в объеме 1 мл (3 мкг белка), покрывая всю поверхность чипа. Реакция сорбирования проходила при 4–8°C на протяжении 18–24 час. Далее чип трижды промывали цитратным буфером и блокировали свободные места 1% раствором БСА (Sigma, США) в цитратном буфере 1 час при КТ. Удаляли раствор БСА, а биочипы тщательно высушивали на воздухе. Готовые биочипы хранили при температуре 4–8°C в стерильных емкостях.

ППР-анализ. Использован ППР-спектрометр “ПЛАЗМОН-6”, разработанный в Институте физики полупроводников НАН Украины (рис. 1).

Это контролируемый компьютером оптоэлектронный спектрометр, в котором используется явление ППР в оптической конфигурации Кречмана. Золотая пленка толщиной 45 нм, которая формирует сенсорную поверхность, нанесена на стеклянную пластинку. В этой пленке

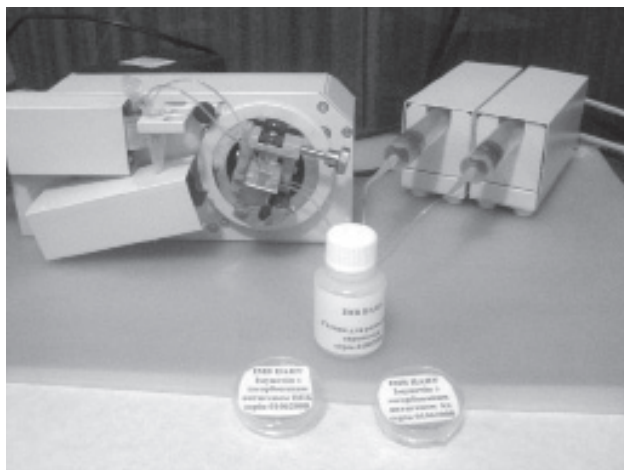


Рис. 1. ППР-спектрометр “ПЛАЗМОН-6”

поляризованный луч от полупроводникового лазерного диода ($\lambda=650\text{нм}$) возбуждает колебание электронной плазмы (поверхностный плазмон). Необходимые условия для возбуждения плазмона создаются специальной призмой, которая может вращаться на контролируемый компьютером угол. Возбуждение плазмонных резонансных колебаний регистрируется прибором как резкое падение интенсивности отраженного от пленки лазерного излучения. Угловая зависимость интенсивности (ППР-кривая) является главной исходящей характеристикой прибора, ее форма, и угловая позиция резонансного минимума позволяют делать оценку показателей преломления и поглощения, а также толщину слоя исследуемого объекта. Преимуществом данного прибора является наличие 2 оптических каналов, которые позволяют дифференцированное измерение между каналами; запись полной ППР кинетической зависимости; минимальное время одного измерения — 0,2 сек (режим slope).

Нанесение исследуемого образца на биочип: в кювету вносили 120 мкл негативной контрольной сыворотки в разведении 1:40, скорость протока составляла 10 мкл/мин на протяжении 10 мин. После чего систему промывали 50 мкл цитратного буфера и вносили в кювету 120 мкл исследуемого образца в разведении 1:40. Взаимодействие антигена с сывороткой происходило на протяжении 10 мин при скорости протока 10 мкл/мин. Систему снова промывали 50 мкл цитратного буфера. Сигналы, фиксирующиеся в ходе эксперимента, а именно отклонение угла минимума, выражались в градусах (программа Plasmon Serial) и в дальнейшем в компьютерной программе OriginPro 7.0 пересчитывалась в угловые секунды с графическим отображением динамики изменения отклика во временном интервале.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе ППР проведены исследования взаимодействия антиген-антитело на модели аденовируса 2 типа. Определены кинетические и концентрационные зависимости между антигенами вируса и специфическими антисыворотками к ним при разных pH и буферных растворов. Созданы экспериментальные образцы биосенсоров для выявления методом ППР вирусных антигенов с помощью иммобилизованных на поверхности золота моноспецифических антител, а также показана возможность детекции специфических антител в сыворотках крови больных

Ад-инфекцией [3]. Гексон — структурный белок аденовируса значительно преобладает в структуре капсида и составляет 240 из 252 капсомеров [1]. Он содержит антигенные детерминанты разной специфичности: широкой (родо-, межподродо- и подродоспецифичные) — общие для аденовирусов млекопитающих и птиц [1]. В нативной вирусной частице экспонирована наружу и функционирует типоспецифическая детерминанта гексона, которая взаимодействует только с анти-сывороткой к гомологичному типу аденовируса. Дегрированный аденовирус полностью теряет инфекционность, что подтверждено вирусологическими методами, антигенные свойства гексона при этом сохранились [3, 4, 7].

Таким образом, результаты предварительного лабораторного исследования свидетельствуют о перспективности изготовления биочипа на основе очищенного гексона или дегрированного аденовируса для широкого использования в диагностике аденовирусных инфекций.

Для лабораторно-экспериментальных исследований использовали биочипы с иммобилизованными на поверхности белками Ад и двуканальный “Плазмон 6” — биосенсор. Канал 1 использовали в качестве контрольного. Через канал 2 (рабочий) для контроля неспецифического связывания антител, сначала вносили негативную сыворотку. После отмывания буфером материала, что не связался, пропускали сыворотку крови больного. На рисунке 2 представлен типичный график исследования образца сыворотки в разработанной тест-системе.

При разработке иммуносенсорной тест-системы высчитывали граничное значение (ГЗ), суммируя среднее значение показателя угла отклонения негативных сывороток (50 сывороток) и трех средних значений отклонений. Сыворотку считали положительной, если показатель угла отклонения превышал ГЗ на 10%. В случае, если значение показателя угла отклонения ниже ГЗ на 10% сыворотка считалась отрицательной.

Качество диагностических систем определяется с помощью научных, медицинских и экономических критериев. К научным критериям принадлежит чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов анализа. Согласно рекомендации ВОЗ, CDC (Centres for Disease Control and Prevention) специфичность и чувствительность определяют путем исследования способности диагностикума, который разрабатывают, выявлять положительные и отри-

цательные сыворотки стандартных контрольных панелей. Методом ИФА были проанализированы около 200 образцов сывороток крови больных. Созданные на их основе положительная и отрицательная панель сывороток были использованы для определения специфичности и чувствительности иммуносенсорной тест-системы. Все сыворотки тестировали в трех повторях. Чувствительность детекции антител с использованием биосенсора определяли как процент количества позитивных сывороток, выявленных методом и подтвержденных ИФА, которая составила для иммуносенсорной тест-системы 98%. Специфичность — это выраженное в процентах соотношение количества сывороток, которые показали негативный результат, к их сумме с количеством ложноположительных результатов. Специфичность сконструированной иммуносенсорной тест-системы составила 100%. Показана высокая воспроизводимость результатов (95%).

Определяли условия и сроки хранения готовых наборов. В наших предыдущих исследованиях было показано, что основной компонент тест-системы, биочип с нанесенным антигеном сохраняется и почти не теряет активности при 4–8°C. В связи с этим были изготовлены образцы тест-системы, которые хранились герметически упакованными при том же температурном режиме. В состав цитратного буфера и негативной сыворотки, которые входят в состав тест-системы добавляли в качестве консерванта 0,02% азида натрия. Исследования показали хорошую

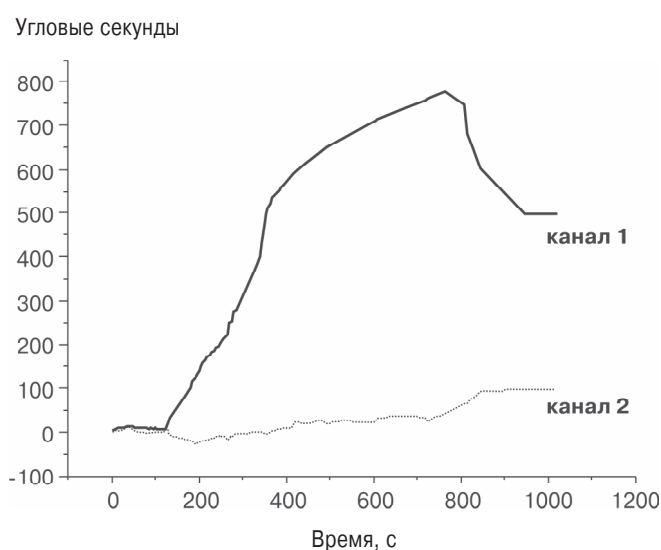


Рис. 2. Анализ сыворотки крови больного на присутствие специфических антител к аденовирусу человека

Таблица 1

Влияние условий хранения тест-системы на уровень отклика

Срок хранения (месяцы)	Отклик на сыворотку больного (угловые секунды)		
	1*	2*	3*
0	1100	1100	1100
1	850	850	820
3	850	850	750
6	800	800	720

* Серии тест-систем.

сохранность образцов тест-системы на протяжении 6 месяцев. Потеря активности не превышала 23% (табл. 1).

Для оценки диагностической эффективности иммуносенсорных тест-систем созданные лабораторные образцы, сыворотки крови больных с разными диагнозами, ИФА тест-системы для выявления специфических IgG к Ад, оптоэлектронный прибор "Плазмон-6" были переданы в лабораторию экспериментальной химиотерапии Института эпидемиологии и инфекционных болезней АМНУ. Оценку диагностической эффективности иммуносенсорной тест-системы проводили, сравнивая результаты с данными ИФА. Лабораторно-экспериментальные испытания тест-системы показали, что она является

достаточно эффективной и специфичной для выявления IgG к аденовирусу человека (табл. 2).

Анализируя полученные результаты по разработке иммуносенсорной тест-системы для выявления антител против Ад в сыворотках крови больных можно сделать вывод о возможности применения метода ППР наряду с другими иммунохимическими методами, в том числе и ИФА. В то же время нанотехнологическая иммуносенсорная тест-система имеет ряд преимуществ: одноступенчатость, не требует использования меченых реагентов, позволяет видеть динамику процесса и получать информацию о ходе проведения анализа, автоматизированное проведение анализа, которое занимает не более 20 минут, что может быть достаточно перспективным для

Таблица 2

Сравнительный анализ результатов выявления специфических антител к аденовирусу в иммуносенсорной и иммуноферментной тест-системах

№ сыворотки	Результаты тестирования образцов сывороток		Результат совпадения ППР/ИФА
	Иммуносенсорная тест-система (у.с.*)	Иммуноферментная тест-система (ОЕ**)	
1	163	0,180	Негативная/негативная
2	550	0,950	Позитивная // позитивная
3	710	0,690	То же
4	820	0,750	»
5	750	0,750	»
6	882	0,930	»
7	132	0,130	Негативная/негативная
8	1100	0,950	Позитивная /позитивная
9	515	0,700	То же
10	130	0,200	Негативная/негативная
11	990	1020	Позитивная/позитивная
Позитивные сыворотки	>750	>0,350	
Негативные сыворотки	<140	<0,200	

Примечание: у.с.* — угловые секунды; ОЕ** — оптические единицы.

использования в лабораторной диагностике аденовирусных инфекций.

Работа была выполнена в рамках комплексной научно-технической программы НАН Украины “Сенсорные системы для медико-экологических и промышленно-технологических потребностей”

ЛИТЕРАТУРА

1. Аденовирус, клетка, организм / Н.С. Дяченко, И. Нас, Д. Беренчи, Л.Н. Носач, Н.П. Ванцак, Л.А. Тарасишин, Е. Адам. — К.: Наук. думка, 1988. — 232 с.
2. Болтовец П. М., Нестерова Н. В. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 3. — С. 86–99.
3. Виявлення антиаденовірусних антитіл методом поверхневого плазмонного резонансу / Л.М. Носач, П.М. Болтовець, С.Д. Загородня, О.Ю. Повниця, А.В. Головань, Н.І. Нетреба, Л.І. Добровичинська // Укр. біохім. журнал. — 2009. — Т. 81, № 4. — С. 39–47.
4. Дослідження взаємодії антиген-антитіло аденовірусу людини методом поверхневого плазмонного резонансу / Л.М. Носач, П.М. Болтовець, О.Ю. Повниця, В.Л. Жовновата, О.М. Захаренко, Б.А. Снопко, Ю.М. Шишов, Н.С. Дяченко // Мікробіол. журнал. — 2005. — Т. 67, № 4. — С. 58–64.
5. Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу / Л.В. Пирогова, М.Ф. Стародуб, В.П. Артюх та ін. // Укр. біохім. журнал. — 2002. — Т. 74, № 3. — С. 88–92.
6. Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and 2 by surface plasmon resonance / C. Wittekindt, B. Fleckenstein, K. Wiesmüller, et al. // J. Virol. Methods. — 2000. — Vol. 87. — P. 133–144.
7. Elaboration of optical immunosensors based on the surface plasmon resonance for detecting specific antibodies and antigens of Epstein-Barr virus and human adenovirus / N.V. Nesterova, L.N. Nosach, S.D. Zagorodnya, O.Y. Povnitsa, P.M. Boltovets, G.V. Baranova, A.V. Golovan // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 67–73.
8. Gomara M.J., Ercill G., Alsina M.A., Haro I. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology // J. Immunol. Methods. — 2000. — Vol. 246. — P. 13–24.
9. Leen A.M., Rooney C.M. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients // Br. J. Haematol. — 2005. — Vol. 128. — P. 135–144.
10. Ramsden J. Optical biosensors // J. Molec. Recogn. — 1997. — № 10. — P. 109–120.
11. Surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* / B.G. Jongerius-Gortemaker, R.L. Goverde, A.A. Bergwerff et al. // J. Immunol. Methods. — 2002. — Vol. 266. — P. 33–44.
12. Walls T., Shankar A.G., Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in pediatric bone marrow transplant patients // Lancet. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 3. — P. 79–86.
13. Wang W.H., Wang H.L. Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // Arch. Pathol. Lab. Med. — 2003. — Vol. 127. — P. 246–248.

ЛАБОРАТОРНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ВИПРОБУВАННЯ ІМУНОСЕНСОРНОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АНТИТІЛ ДО АДЕНОВІРУСІВ ЛЮДИНИ

Н.В. Нестерова, С.Л. Рибалко, Л.М. Носач,
О.Ю. Повниця, С.Д. Загородня, Г.В. Баранова,
А.В. Головань

Розроблені експериментальні серії імунодатчиків на основі приладу “Плазмон 6” для експресної діагностики антитіл до аденовірусів в сироватках крові людей. Проведені лабораторно-експериментальні випробування зразків імуносенсорної тест-системи показали, що вона є досить ефективною, специфічною і може бути використана при діагностиці хвороб, обумовлених цим вірусом.

LABORATORY EXPERIMENTAL EXAMINATION OF IMUNOSENSORY TEST-SYSTEM FOR DETECTION OF ANTIBODY TO HUMAN ADENOVIRUSES

N.V. Nesterova, S.L. Rybalko, L.M. Nosach,
O.Yu. Povnitsa, S.D. Zagorodnya, G.V. Baranova,
A.V. Golovan

Developed a series of experimental immunosensors based on device “Plasmon 6” for rapid diagnosis of antibodies to adenoviruses in the human serum. Conducted laboratory and pilot testing of the samples immunosensory test system showed that it is quite effective, specific and can be used to diagnose diseases caused by this virus.

УДК 577.21:616-074

Л.М. Александрова,¹ С.И. Беленец,¹
Т.А. Габур,¹ Е.Ю. Аристова,²
Л.С. Гаврилюк,² А.Л. Дробина,²
В.О. Бузыревский²

КРЕАТИНИН. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ

¹ “Реагент”, г. Днепропетровск,

² Городская больница № 7, г. Днепродзержинск

Креатинин — производное креатина, образующегося при его дегидратации, т. е. когда в мышечной ткани происходит разрушение макроэнергетического вещества креатинфосфата с выделением утилизируемой сократительными волокнами порции энергии, остатка неорганического фосфора и молекулы воды. Креатинин, будучи беспороговым веществом, выделяется с мочой.

Повышение содержания креатинина в крови наблюдается при: нарушении функции почек