

Метрология, стандартизация, контроль

УДК 617.017: 615.371: 577.1

О.Н. КАПЛИНА*, Л.И. КАРПЕНКО, В.С. КАПЛИН, Л.Р. ЛЕБЕДЕВ, А.А. ИЛЬИЧЕВ, М.П. БОГРЯНЦЕВА

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, 630559

e-mail: okaplina@vector.nsc.ru;
forelat@ngs.ru

ИФА-тест-система для контроля качества вакцины «КомбиВИЧвак» при ее производстве

Разработана ИФА-тест-система для оценки активности анти-ВИЧ-1 вакцины «КомбиВИЧвак». Созданы стандартные панели отрицательных и положительных образцов сыворотки мышей. Оптимизированы условия проведения анализа с использованием в качестве антигена полиэпитопного рекомбинантного белка ТВ1. Оценена вирус-нейтрализующая активность сывороток иммунизированных человека и мыши и установлены высокая специфичность и чувствительность разработанной тест-системы. Результаты, полученные с использованием данной системы, были подтверждены с помощью аналитической системы NewLayBlot; было показано, что все образцы, которые были идентифицированы как положительные с помощью предлагаемой тест-системы, содержали характерные белки ВИЧ-1. Проведена валидация тест-системы: определены ее внутрилабораторная и межлабораторная прецизионность. Воспроизводимость результатов, полученных с применением данной системы, составляла 2–10% при величине удовлетворительной воспроизводимости, равной 19%.

Ключевые слова: антигела, вакцина против ВИЧ-1, валидация, ИФА-тест-система, полиэпитопный белок ТВ1, специфичность, чувствительность.

Создание вакцины против ВИЧ-инфекции чрезвычайно актуально, поскольку это самый надежный способ остановить эпидемию СПИДа, которая распространяется угрожающими темпами. Более 30 лет над решением этой задачи работают многие исследователи разных стран. Трудность создания вакцины против СПИДа связана с высокой вариабельностью вируса, его способностью адаптироваться к защитным механизмам иммунной системы и индуцировать иммунопатологию, а также отсутствием адекватных моделей инфекции у животных [1].

Стало очевидно, что для проектирования более совершенных ВИЧ-вакцин необходимы новые нетрадиционные подходы. К ним можно отнести кон-

струирование синтетических полиэпитопных анти-ВИЧ-1-иммуногенов, использующих широкий спектр протективных Т- и В-клеточных эпитопов основных вирусных антигенов, способных индуцировать образование широконейтрализующих антител и ответ цитотоксических (CD8+ CTL) и хелперных (CD4+ Th) Т-лимфоцитов [2–5]. Во ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» разработана кандидатная вакцина против ВИЧ-1/СПИД «КомбиВИЧвак», в состав которой вошли два искусственных полиэпитопных иммуногена ТВ1 и ТС1. Искусственный белок ТВ1 был спроектирован для стимуляции ВИЧ-специфического гуморального иммунного ответа, а иммуноген ТС1 — для усиления клеточно-

Каплина Ольга Николаевна, Карпенко Лариса Ивановна, Каплин Владимир Сергеевич, Лебедев Леонид Рудольфович, Ильичев Александр Алексеевич, Богрянцева Марина Поликарповна.

Список сокращений: АГ — антиген; АТ — антитела; БСА — бычий сывороточный альбумин; в/м — внутримышечно; ВГС — вирус гепатита С; ИБ — иммуноблоттинг; ИН — индекс нейтрализации; ИФА — иммуноферментный анализ; КББ — карбонат-бикарбонатный буфер; ОВА — овальбумин; ОП — оптическая плотность; ПААГ — полиакриламидный гель; ПЭГ — полиэтиленгликоль; РБР-С, РБР-К — разводящий буферный раствор для сывороток и конъюгата, соответственно; СПОС — стандартная панель отрицательных сывороток; СППС — стандартная панель положительных сывороток; ФСП — фармакопейная статья предприятия; PBS — фосфатно-солевой буфер; p-NPP — *n*-нитрофенилфосфат; SDS — додецилсульфат натрия; ТВ1 (T and B cell epitopes-containing immunogen) — иммуноген, содержащий эпитопы Т- и В-клеток; ТС1 (T-cell immunogen) — иммуноген Т-клеток.

* Автор для переписки.

го ответа. Полиэпитопный белок ТВ1 — сконструированный полипептид с заранее заданной третичной структурой, содержащий эпитопы из белков Env и Gag ВИЧ-1 [6, 7]. В состав ТСИ включены эпитопы (как CD8⁺ CTL, так и CD4⁺ Th) из основных вирусных белков Env, Gag, Pol и Nef, которые являются высококонсервативными для трех субтипов ВИЧ-1 (А, В и С). Вакцина «КомбиВИЧвак» представляет собой искусственные вирусоподобные частицы, в центре которых находится плазмида рсDNA-ТСИ (ДНК-вакцина), а на поверхности — белок ТВ1, конъюгированный с полиглюкином [6, 7].

Проблема оценки гуморального иммунного ответа на искусственные иммуногены состоит в том, что коммерческие ИФА-тест-системы, которые применяются для определения антител к ВИЧ-1 у инфицированных пациентов, в этом случае могут давать неадекватные результаты. Одна из причин заключается в том, что в качестве антигенов в коммерческих тест-системах используют рекомбинантные полипептиды, соответствующие фрагментам вирусных белков, которые проявляют сильные антигенные свойства и являются иммунодоминантными (в основном это коровые белки вируса). Состав эпитопов в коммерческих полипептидах может не совпадать с набором эпитопов, которые включены в состав белка ТВ1 и не являются иммунодоминантными, но отвечают за формирование нейтрализующих антител.

В связи с этим для контроля качества серий вакцины «КомбиВИЧвак» при производстве, а также для проведения доклинических исследований было необходимо разработать лабораторную ИФА-тест-систему и провести ее валидацию.

Целью настоящего исследования являлась разработка и валидация лабораторной ИФА-тест-системы для контроля гуморального ответа, индуцированного вакциной «КомбиВИЧвак», у лабораторных животных.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение и очистка антигена. В качестве антигена для сорбции на твердой фазе в ИФА использовали рекомбинантный белок ТВ1. Получение и очистка белка ТВ1 были проведены, как описано ранее в работе [8]. Оценку чистоты рекомбинантного белка проводили с помощью электрофореза в 15%-ном SDS-ПААГ (в денатурирующих условиях). Содержание белка оценивали путем анализа полос, полученных в результате электрофореза, с использованием компьютерной программы «Gel-pro analyzer, Ver.3.1» (Media Cybernetics

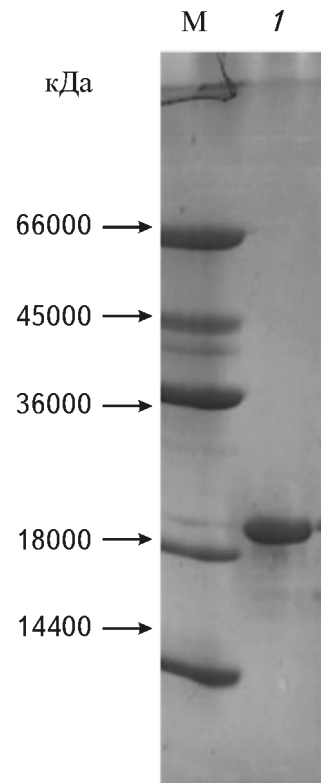


Рис. 1. Электрофореграмма белка ТВ1 в 15%-ном SDS-ПААГ: М — маркеры молекулярной массы; 1 — белок ТВ1

Inc., США). Чистота белка ТВ1, используемого в тест-системе, составляла более 95 % (рис. 1).

Иммунизация лабораторных животных.

В качестве тест-объекта использовали мышей линии *BALB/c* (самцы массой 16—18 г в количестве 10 шт. в каждой группе) из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Для иммунизации лабораторных животных опытной группе вводили вакцину «КомбиВИЧвак», а контрольной — 0,9%-ный раствор хлорида натрия. Для оценки специфической активности вакцины в доклинических испытаниях применяли двукратную схему иммунизации: препарат вакцины (одну дозу) вводили внутримышечно в первый и на 28-й день от начала иммунизации в объеме 0,2 мл. Одна доза вакцины «КомбиВИЧвак» содержала 75 мкг плазмиды рсDNA-ТСИ и 50 мкг белка ТВ1. Кровь мышей отбирали и анализировали через 7 дней после последней иммунизации.

Определение титра специфических антител с помощью ИФА. Для выявления титра специфических антител в сыворотках мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак», проводили сорбцию антигена (АГ) в объеме 100 мкл/лунку 96-луночного планшета (Greiner Bio-One, Германия). В качестве антигена использовали белок ТВ1 в концентрации 5 мкг/мл в карбонат-бикарбо-

натном буфере (КББ), рН=9,6 (таблетированная форма, «Медиген», Россия). Инкубировали 2 ч при температуре 37° и затем 16 ч при 4°. Раствор АГ удаляли путем стряхивания и в лунки вносили по 200 мкл блокирующего буфера (1%-ный раствор казеина (Merck, Германия) в фосфатно-солевом буфере (PBS, таблетированная форма, рН=7,4, «Медиген»), с добавлением 0,05% твина-20 (Amresco, США). Смесь инкубировали 2 ч при температуре 37° в термостате и после этого лунки планшета 4-кратно автоматически промывали на приборе Washer (BioRad, США) раствором PBS с 0,05% твина-20 в объеме 350 мкл/лунку. В лунки ряда А вносили по 100 мкл всех образцов сывороток иммунизированных животных, разведенных в 200 раз, с последующим 3- или 5-кратным титрованием. Для контроля конъюгата в лунки без образцов сывороток вносили 0,5%-ный раствор казеина в PBS с 0,05% твина-20. Смесь инкубировали 1,5 ч при температуре 37° на термошейкере (Termo Shaker PST-60 HL-4) (Biosan, Латвия). После инкубации лунки планшета 4-кратно автоматически промывали. Раствор конъюгата антител козы против IgG мыши со щелочной фосфатазой (Sigma, США) в 0,5%-ном растворе казеина в PBS с 0,05% твина-20 в разведении 1:40000 вносили в лунки в количестве 100 мкл, инкубировали 1 ч при покачивании и температуре 37°, после чего лунки планшета 4-кратно автоматически промывали. Для проявления цветной реакции использовали раствор хромогена *p*-нитрофенилфосфата (*p*-NPP) в 0,2 М трис-НСl-буфере, рН=4,5, в концентрации 1 мг/мл (Sigma). Смесь инкубировали 12 ч при температуре 37°. Величину ОП измеряли при длине волны 405 нм с помощью планшетного сканера (Microplate Reader) (BioRad).

За титр принимали последнее разведение исследуемой сыворотки, значение ОП которой превышает значение ОП_{крит.}, которое рассчитывали по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.} \cdot K_k \cdot 2,$$

где ОП_{ср.} K_к — среднее значение оптической плотности контрольного конъюгата. Как указано выше, результаты теста считали положительными, если ОП анализируемой сыворотки было больше ОП_{крит.}; соответственно их считали отрицательными, если ОП сыворотки было меньше или равно ОП_{крит.}.

Реакция вирусной нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили согласно методике, описанной в работах [6, 9]. В реакции вирусной нейтрализации были использованы штамм ГКВ-

4046 ВИЧ-1 и чувствительные к вирусу клетки *MT4* (коллекция ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»).

В качестве положительного контроля использовали сыворотку ВИЧ-инфицированного пациента, а в качестве отрицательных контролей — нормальную человеческую сыворотку и нормальную мышиную сыворотку. Все сыворотки получены из венозной крови и охарактеризованы соответственно в Новосибирском государственном областном центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями и в Новосибирском центре крови. Результаты учитывали на четвертые сутки, определяя содержание вирусного белка р24 в каждом образце с помощью ИФА. («Тест-система иммуноферментная для определения белка р24 вируса ВИЧ-1», «ЗАО Вектор-Бест», Кольцово, Новосибирская обл.).

Индекс нейтрализации вирусной активности (ИН) рассчитывали по формуле:

$$ИН = (ОП_1 - ОП_2) / (ОП_1 - ОП_к) \cdot 100\%,$$

где ОП₁ — ОП сыворотки, представляющей негативный контроль, ОП₂ — ОП тестируемой сыворотки; ОП_к — ОП неинфицированных клеток.

Степень вирусной репликации в опыте рассчитывали как отношение концентрации белка р24 при применении сыворотки иммунизированного животного к концентрации этого белка при использовании нормальной мышиную сыворотки. Реакцию вирусной нейтрализации анализировали при жизнеспособности клеток *MT-4* не менее 80%.

Определение специфических антител в системе иммуноблотинга (ИБ). Определение специфических антител в сыворотках мышей проводили с использованием коммерческой тест-системы NewLavBlot (BioRad), предназначенной для выявления специфических антител к нативным белкам ВИЧ-1. Процедуру проводили согласно инструкции фирмы-изготовителя с небольшими модификациями. Так, для образцов сывороток мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧ-вак», и для сывороток мышей, которым вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия (отрицательный контроль), использовали конъюгат антител козы против IgG мыши с щелочной фосфатазой в разведении 1:5000. В качестве положительного контроля брали ВИЧ-позитивную сыворотку и конъюгат из набора NewLavBlot. После проявления нитроцеллюлозных стрипов наблюдали окрашивание полос, соответствующих определенной фракции вирусного белка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуноферментный анализ является наиболее удобным и распространенным методом исследования гуморального иммунитета при оценке эффективности противовирусных вакцин. Из доступных в России в настоящий момент коммерческих ИФА-тест-систем ни одна не может быть использована для тестирования специфической активности полиэпитопной вакцины «КомбиВИЧвак». Возможная причина состоит в том, что состав эпитопов в белках, используемых в коммерческих наборах реагентов, не совпадает с полиэпитопами белка ТВ1, входящего в состав вакцины «КомбиВИЧвак».

Для доказательства того, что при введении «КомбиВИЧвак» формируются антитела, способные узнавать ВИЧ-1, мы использовали набор NewLavBlot, на стрипах которого сорбированы отдельные белки лизата ВИЧ-1. В результате было показано, что в сыворотках крови животных, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак», присутствуют антитела, специфически узнающие антигены ВИЧ-1.

Одним из основных показателей эффективности вакцины является способность индуцировать антитела, которые могут не только узнавать, но и нейтрализовать вирус. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток была проведена в системе *in vitro* на культуре клеток МТ-4 (табл. 1). Сыворотки мышей, иммунизированных «КомбиВИЧвак», эффективно подавляли вирусную репликацию на зараженной вирусом ВИЧ-1 (штамм ГКВ4046) культуре клеток. Тот же эффект наблюдали и при использовании сыворотки инфицированного человека. Таким образом, с использованием данной системы ИФА показано, что кандидатная вакцина «КомбиВИЧвак» индуцирует вирусспецифический гуморальный ответ, причем продуцируемые антитела высокоспецифичны: они не толь-

ко распознают антигены ВИЧ-1, но и способны нейтрализовать вирус в системе *in vitro*. Данные результаты, таким образом, подтверждают данные, полученные ранее с использованием других тест-систем [6, 7]. Все они свидетельствуют о том, что В-клеточные эпитопы в составе частиц «КомбиВИЧвак» доступны для узнавания В-клетками и конформационно близки природным эпитопам ВИЧ-1 белков.

В связи с этим для проведения контроля специфической активности «КомбиВИЧвак» на производстве, а также при доклинических исследованиях вакцины мы разработали ИФА-тест-систему, в качестве антигена в которой был использован рекомбинантный белок ТВ1, входящий в состав самой вакцины «КомбиВИЧвак» и отвечающий за формирование гуморального иммунного ответа.

Конструирование иммуноферментной тест-системы включало поиск оптимальных параметров, от которых зависят чувствительность и специфичность проводимой реакции. Важным фактором являлось определение условий адсорбции антигена на твердой фазе, т.е. установление оптимальной концентрации антигена, состава сенсibiliзирующего буфера, условий отмычки несвязавшихся компонентов, времени и температуры связывания антигена с поверхностью лунок полистироловых планшетов и рабочей дозы специфического антивидового конъюгата.

Для подбора оптимальных условий сорбции оценивали интенсивность иммуноферментной реакции при различных концентрациях антигена (рекомбинантного белка ТВ1) в растворе КББ. Недостаток антигена приводит к снижению чувствительности теста, а избыток — к перерасходу дорогостоящего реагента. На достоверность результатов ИФА оказывает влияние неспецифическое связывание реагентов со свободными сайтами полистироловых планшетов. В наших экспериментах мы испытывали различные концентрации ан-

Таблица 1

Оценка вируснейтрализующей активности сывороток в предлагаемой системе ИФА

Образец	ИН, %	
	Разведение сыворотки 1:10	Разведение сыворотки 1:50
Объединенная сыворотка иммунизированных «КомбиВИЧвак» мышей	81,90	75,60
Сыворотка ВИЧ-инфицированного человека («СПИД-центр» Новосибирска)	99,41	77,83

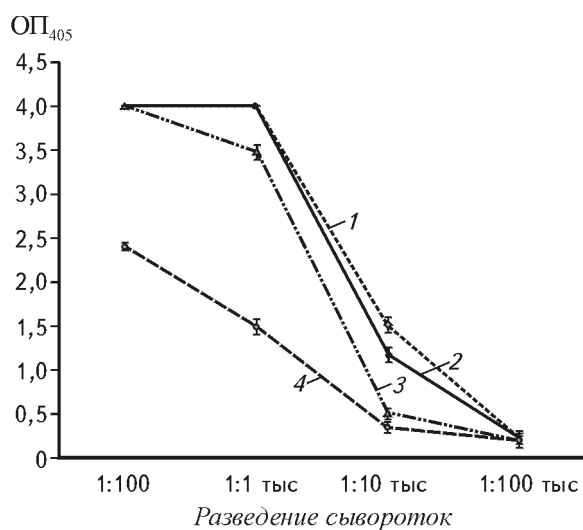


Рис. 2. Зависимость сорбционной способности антигена от его концентрации, мкг/мл: 1 — 25; 2 — 5; 3 — 1; 4 — 0,2

тигена: 0,2 мкг/мл; 1,0; 5,0 и 25,0 мкг/мл. Процесс адсорбции антигена оценивали по интенсивности реакции с контрольными позитивными и негативными сыворотками лабораторных животных. Наиболее близкое к оптимальному насыщение поверхности планшетов достигалось при концентрации белка ТВІ, равной 5 мкг/мл; повышение концентрации до 25 мкг/мл практически не приводило к увеличению чувствительности тест-системы (рис. 2).

С целью снижения неспецифической сорбции были проведены исследования по уменьшению фоновых «помех» при использовании различных концентраций бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Amresco, США), овальбумина (ОВА) (Sigma), полиэтиленгликоля (ПЭГ) (Panreac, Испания) и казеина (Merck), входящих в состав буферных растворов для сорбции АГ, разведения конъюгата и промывки планшетов. Вышеуказанные реагенты были использованы в следующих концентрациях: 0,1%; 0,5%; 1% и 2%, соответственно. Установлено, что применение 1%-ного раствора казеина в PBS, pH 7,5, с добавлением 0,05% тви-

на-20 обеспечивало минимальные фоновые «помехи» при постановке ИФА.

Важным параметром, влияющим на чувствительность ИФА, является pH сорбирующего буфера. В полистироловые планшеты вносили антиген (белок ТВІ) в различных буферных растворах — ацетатном, PBS и КББ — и с различным pH, от 4,0 до 10,0. Использование КББ при pH=9,6 обеспечивало самый высокий уровень адсорбции белка ТВІ на поверхности планшетов.

На следующем этапе изучали влияние температуры и времени экспозиции на адсорбцию белка ТВІ в лунках планшета. Было показано, что оптимальным для сенсibilизации лунок антигеном является следующий режим: температура 37° в течение 2 ч и затем ночь (18 ч) при 4°.

Для определения оптимального уровня активности антивидового конъюгата антител со щелочной фосфатазой (Sigma) при проведении ИФА подбирали рабочее разведение, дающее максимально интенсивную цветную реакцию. Кроме того, оптимальным считали разведение конъюгата, при котором ОП положительного контроля была не менее 2,1 и отрицательного — не более 0,2. Разведение конъюгата варьировали в диапазоне от 1:30000 до 1:50000. Лучшие показатели наблюдали при разведении конъюгата 1:40000 (табл. 2).

В процессе производства вакцин «КомбиВИЧвак» в качестве стандарта была выбрана и аттестована вакцина серии 07, которая по всем показателям отвечала требованиям, заложенным в проекте фармакопейной статьи предприятия (ФСП).

Для оценки специфичности разработанной тест-системы нами были сформированы две панели сывороток: стандартная панель положительных сывороток (СППС), состоящая из 8 положительных сывороток крови мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак», серия 07; стандартная панель отрицательных сывороток (СПОС), включающая в себя 4 образца сыворотки крови мышей, иммунизированных 0,9%-ным раствором натрия хлорида; 2 образца сыворотки крови мышей, им-

Таблица 2

Показатели ОП позитивного и негативного контроля при различных разведениях конъюгата

Разведение	1:10000	1:40000	1:160000
K ⁺	2,501 ± 0,45	2,101 ± 0,28	0,864 ± 0,26
K ⁻	0,432 ± 0,13	0,198 ± 0,15	0,104 ± 0,08
ОП _{K⁺} / ОП _{K⁻}	8,1	10,6	8,3

мунизированных антигеном вируса гепатита С (ВГС), и 2 образца сыворотки крови мышей, иммунизированных антигеном конго-крымской геморрагической лихорадки. Для оценки специфичности тест-системы применяли образцы СПОС, которые в данной тест-системе показали отрицательный результат (данные не приведены).

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана тест-система для выявления антител, индуцированных вакциной «КомбиВИЧвак», на основе метода твердофазного иммуноферментного анализа, включающая иммуносорбент, контрольную положительную сыворотку (K^+), контрольную отрицательную сыворотку (K^-), конъюгат антител с щелочной фосфатазой ($Kг$), разводящий буферный раствор для сывороток (РБР-С), разводящий буферный раствор для конъюгата (РБР-К), раствор хромогена — *p*-нитрофенилфосфата (*p*-NPP) в 0,2 М трис-НСl-буфере (Sigma), буфер для промывки планшета — фосфатно-солевой буфер с 0,05% твина-20 (ФСБ-Т, 25-кратный концентрат).

Установлены оптимальные параметры и условия проведения разработанного теста: сорбция на планшете белка ТВ1 в концентрации 5 мкг/мл, разведенного в 0,1 М КББ, рН = 9,6; блокирование свободных сайтов связывания 1%-ным раствором казеина в буфере; экспозиция антител на планшете в течение 2 ч при 37° и 18 ч при 4°; экспозиция антител с иммуносорбентом 90 мин при 37°; рабочее разведение антивидового конъюгата со щелочной фосфатазой 1:40000; инкубация конъюгата с антителами на иммуносорбенте в течение 60 мин при 37°.

В результате испытаний установлены высокая специфичность и чувствительность тест-системы, что свидетельствует о ее пригодности для проведения контроля специфической активности вакцины «КомбиВИЧвак».

С помощью разработанной тест-системы проводили оценку специфической активности вакцины «КомбиВИЧвак» серии 05 (рис. 3), предназначенной для проведения I фазы клинических испытаний. В качестве подтверждающего теста использовали коммерческий набор NewLavBlot. Во всех образцах, которые были идентифицированы как положительные с помощью разработанной нами ИФА-тест-системы, с использованием набора NewLavBlot были обнаружены АТ к белкам p55, p40, p25/24, p18/17, что свидетельствует о наличии в сыворотках АТ к ВИЧ-1; в образцах отрицательных сывороток подобные белки не были обнаружены, что свидетельствует об отсутствии в сыворотках АТ к ВИЧ-1. Полное совпадение ре-

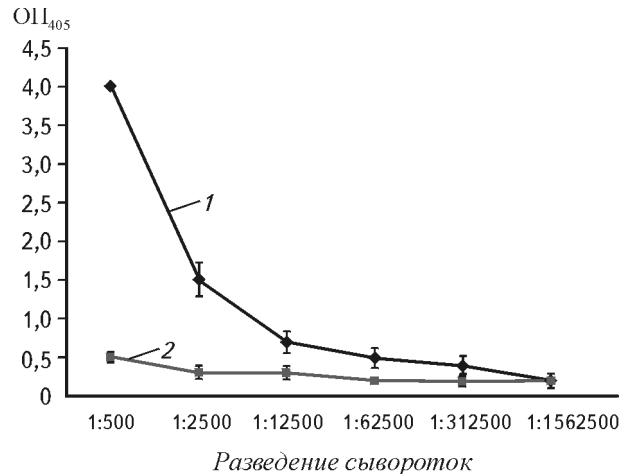


Рис. 3. Титр антител в сыворотке крови иммунизированных мышей, определенный с помощью разработанной тест-системы: 1 — иммунизация вакциной «КомбиВИЧвак», 0,5 серия; 2 — иммунизация 0,9 %-ным NaCl

зультатов с использованием ИФА-тест-системы и NewLavBlot свидетельствует о высокой чувствительности и специфичности разработанной нами тест-системы (рис. 4).

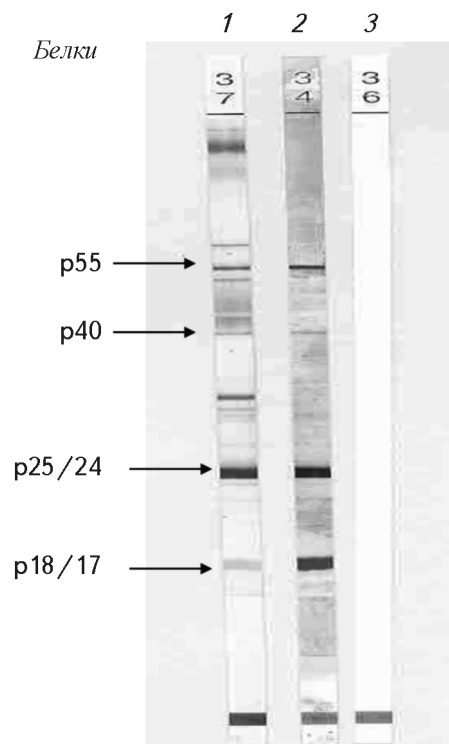


Рис. 4. Анализ сывороток крови мышей в системе NewLavBlot: 1 — сыворотка крови человека, положительный контроль из набора NewLavBlot; 2 — объединенная сыворотка крови мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак»; 3 — объединенная сыворотка крови мышей, иммунизированных 0,9%-ным раствором хлорида натрия

Таблица 3

Результаты внутрилабораторной воспроизводимости ОП образцов в различных сериях тест-системы

Образец сыворотки	Номер серии тест-системы										Среднее значение	Коэффициент вариации CV, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
КО1	1,55	1,58	1,54	1,68	1,61	1,54	1,69	1,65	1,59	1,54	1,6	6
КО2	0,31	0,21	0,28	0,34	0,2	0,21	0,29	0,33	0,38	0,39	0,29	7
КО3	0,12	0,2	0,11	0,21	0,22	0,21	0,1	0,21	0,1	0,1	0,16	5
Кк	0,05	0,11	0,05	0,06	0,12	0,18	0,16	0,06	0,06	0,09	0,09	5

Примечание: ОП_{крит.} = 2ОП Кк = 0,18; среднее значение ОП КО1 = 1,6 (> ОП_{крит.}, подтверждает К⁺); среднее значение ОП КО2 = 0,29 (> ОП_{крит.}, подтверждает К⁺); среднее значение ОП КО3 = 0,16 (< ОП_{крит.}, подтверждает К⁻).

Для подтверждения того, что разработанная тест-система обеспечивает получение достоверных результатов, была проведена оценка ее основных валидационных характеристик: прецизионность (сходимость и воспроизводимость), специфичность и чувствительность.

Как внутрилабораторную, так и межлабораторную прецизионность предложенной тест-системы ИФА оценивали с применением контрольных образцов. Внутрисерийную воспроизводимость (сходимость результатов) получали с помощью одного и того же метода в одной и той же лаборатории с участием одного и того же операто-

ра и с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени (внутрилабораторная прецизионность). Образец КО1 с высоким содержанием АТ к ВИЧ-1 использовали для оценки сходимости результатов и текущего оперативного контроля; контрольный образец КО2 с низким содержанием АТ к ВИЧ-1 — для оценки чувствительности системы, значение ОП которого превышает ОП_{крит.}; контрольный образец КО3, не содержащий АТ к ВИЧ-1, — для оценки специфичности тест-системы, значение ОП которого ниже ОП_{крит.} (табл. 3).

Таблица 4

Результаты межлабораторной сходимости ОП образцов в различных сериях тест-системы

Образец сыворотки	В лаборатории			В ОБТК			Коэффициент вариации CV, %
	Номер серии тест-системы			Номер серии тест-системы			
	1	2	3	1	2	3	
КО1	1,66	1,62	1,65	1,64	1,61	1,58	2
КО2	0,25	0,25	0,28	0,24	0,22	0,26	8
КО3	0,15	0,18	0,14	0,18	0,17	0,2	13
Кк	0,09	0,11	0,08	0,11	0,12	0,09	15

Примечание: ОП_{крит.} = 2ОП Кк = 0,20; среднее значение ОП КО1 (для двух лабораторий) = 1,62 (> ОП_{крит.}, подтверждает К⁺); среднее значение ОП КО2 (для двух лабораторий) = 0,25 (> ОП_{крит.}, подтверждает К⁺); среднее значение ОП КО3 (для двух лабораторий) = 0,17 (< ОП_{крит.}, подтверждает К⁻); среднее значение ОП Кк (для двух лабораторий) = 0,10.

Образцы КО1 и КО2 представляли собой объединенную сыворотку мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак»; образец КО3 — иммунизированных 0,9 %-ным хлоридом натрия. Коэффициент позитивности КО1 и КО3 в данной тест-системе вычисляли по формуле:

$$K_{\text{поз}} = \text{ОП}_{\text{обр.}} / \text{ОП}_{\text{крит.}}$$

где ОП_{обр.} — оптическая плотность образца.

Позитивность контрольных образцов подтверждали методом иммуноблотинга с использованием коммерческой тест-системы NewLavBlot. Контрольный образец КО1 показал наличие АТ к белкам ВИЧ-1, КО3 — отсутствие АТ к белкам ВИЧ-1 (рис. 5).

Межлабораторную воспроизводимость (сходимость результатов) оценивали с использованием одного и того же метода в разных лабораториях, в разное время (межлабораторная прецизионность, табл. 4).

Для оценки вариации результатов неколичественного ИФА (сходимости) применяли параметры вариационной статистики, т.е. среднее арифметическое значение, среднее квадратичное отклонение и коэффициент вариации CV [10].

Среднее арифметическое X было равно:

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Среднее квадратичное отклонение S рассчитывали как:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X)^2}{n - 1}}$$

где x_i — измеренное значение показателя; n — количество измерений показателя.

Коэффициент вариации CV , %, определяли из формулы:

$$CV = \frac{S}{X} \cdot 100\%$$

Воспроизводимость считается удовлетворительной при величине CV не более 19%.

Воспроизводимость нашей тест-системы укладывается в диапазоне значений от 2 до 15%. Полученные данные свидетельствуют о соответствии внутрисерийной вариации установленным нормам.

Таким образом, было показано, что разработанная нами тест-система пригодна для контроля гуморального иммунного ответа, индуцированного вакциной «КомбиВИЧвак» у лабораторных животных, и обеспечивает достоверность получаемых результатов.

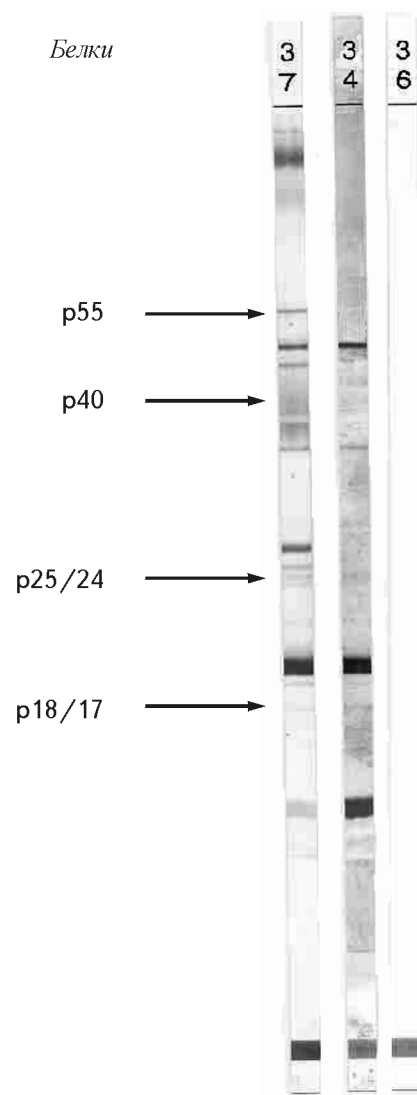


Рис. 5. Оценка позитивности контрольных образцов КО1 и КО3: 1 — K^+ (положительный контроль) сыворотка крови ВИЧ-положительного человека; 2 — образец КО1 — объединенная сыворотка крови мышей, иммунизированных вакциной «КомбиВИЧвак»; 3 — контрольный образец КО3 — объединенная сыворотка крови мышей, иммунизированных 0,9 %-ным раствором хлорида натрия

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках конкурсной части государственного задания в сфере научной деятельности ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный университет» (код проекта 303) «Комбинаторная биология как платформа для создания медико-биологических препаратов».

Получено 20.07.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Esparza, J.* A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine // *Vaccine*. — 2013. — V. 31(35). — P. 3502—3518.
2. *Fisher, W.* Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants / W. Fisher, S. Perkins, J. Theiler, T. Bhattacharya, K. Yusim, R. Funkhouser, C. Kuiken, B. Haynes, N.L. Letvin, B.D. Walker, B.H. Hahn, B.T. Korber // *Nature Med.* — 2007. — V. 13(1). — P. 100—106.
3. *McMichael, A.J.* Lessons learned from HIV-1 vaccine trials: new priorities and directions / A.J. McMichael, B.F. Haynes // *Nature Immunol.* — 2012. — V. 13(5). — P. 423—427.
4. *Bazhan, S.I.* Rational design-based synthetic polyepitope DNA vaccine for eliciting HIV-specific CD8+T cell responses / S.I. Bazhan, L.I. Karpenko, T.N. Ilyicheva, P.A. Belavin, S.V. Seregin, N.K. Danilyuk, D.V. Antonets, A.A. Ilyichev // *Mol. Immunol.* — 2010. — V. 47(7—8). — P. 1507—1515.
5. *Karpenko, L.I.* Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12 / L.I. Karpenko, N.S. Scherbakova, A.N. Chikhaev, O.Y. Tumanova, L.R. Lebedev, L.A. Shalamova, O.G. Pyankova, A.B. Ryzhikov, A.A. Ilyichev // *Mol. Immunol.* — 2012. — V. 50(4). — P. 193—199.
6. *Karpenko, L.I.* Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine. Design, immunogenicity and toxicity studies / L.I. Karpenko, A.A. Ilyichev, A.M. Eroshkin, L.R. Lebedev, R.V. Uzhachenko, N.A. Nekrasova, O.A. Plyasunova, P.A. Belavin, S.V. Seregin, N.K. Danilyuk, E.D. Danilenko, V.I. Masycheva, S.I. Bazhan // *Vaccine*. — 2007. — V. 25(21). — P. 4312—4323.
7. *Карпенко Л.И.* Вакцина «КомбиВИЧвак», содержащая полиэпитопные В- и Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1 / Л.И. Карпенко, С.И. Бажан, А.М. Ерошкин, Л.Р. Лебедев, Р.В. Ужаченко, Н.А. Некрасова, О.А. Плясунова, П.А. Белавин, С.В. Серегин, Н.К. Данилюк, Е.Д. Даниленко, Б.Н. Зайцев, В.И. Масычева, А.А. Ильичев, Л.С. Сандахчиев // *Докл. Акад. наук*. — 2007. — Т. 413(4). — С. 553—556.
8. *Волосникова Е.А.* Очистка рекомбинантного белка ТБИ — антигена ВИЧ / Е.А. Волосникова, Л.Р. Лебедев, Н.И. Акулова // *Биотехнология*. — 2010. — № 4. — С. 65—68.
9. *Карамов Э.В.* Кандидатные анти-ВИЧ-вакцины индуцируют сильный нейтрализационный ответ / Э.В. Карамов, Т.В. Павлова, Г.В. Корнилаева, И.Г. Сидорович, С.И. Бажан // *Аллергия, астма и клин. иммунол.* — 2003. — № 9. — С. 151—158.
10. *Нетесова И.Г., Бобкова М.Р.* Внутрелабораторный контроль качества не количественных методов ИФА: Информационно-методическое пособие. — Новосибирск—Москва: Изд-во ЗАО «Вектор-Бест», 2011. — С. 1—18.

O.N. KAPLINA*, L.I. KARPENKO, V.S. KAPLIN,
L.R. LEBEDEV, A.A. ILICHEV, and M.P. BOGRYANTSEVA

State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector»,
630559, Kol'tsovo, Novosibirskaya oblast Russia

e-mail: okaplina@vector.nsc.ru;
forelat@ngs.ru

An ELISA-based Test System for the KombiVICHvak Anti-HIV Vaccine Control during its Production

A test system to assess the activity of the KombiVICHvak anti-HIV-1 vaccine has been designed. Standard panels of negative and positive samples of murine sera were created. The conditions for the analysis using a polyepitope recombinant protein TBI were optimized. The virus-neutralizing activity of the vaccine was assessed in sera of immunized human and mice, and a high specificity and sensitivity of the designed test-system was demonstrated. The results obtained using this system were confirmed in the assay with the NewLavBlot analytical set; it was shown that all the samples that were identified as positive by the suggested test system contained the HIV-1 characteristic proteins. The validation was performed; the intra- and inter-laboratory accuracies of the designed system were determined. The reproducibility of the system was equal to 2—10% with the satisfactory value equal to 19%.

Key words: antibodies, anti-HIV-1 vaccine, ELISA-based test system, polyepitope TBI protein, sensitivity, specificity, validation.

* Author for correspondence.