

УДК 57.083.3: 616-002.5

Д.В. СОТНИКОВ<sup>1,\*</sup>, А.В. ЖЕРДЕВ<sup>1</sup>, В.Г. АВДИЕНКО<sup>2</sup>, Б.Б. ДЗАНТИЕВ<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071

<sup>2</sup>Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, Москва, 107564

e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru  
sotnikov-d-i@mail.ru

## Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото—антиген

Предложена новая методика иммунохроматографической серодиагностики туберкулеза, основанная на взаимодействии содержащихся в сыворотке крови специфических к *Mycobacterium tuberculosis* иммуноглобулинов с конъюгатом маркер—антиген и последующем связывании образовавшегося комплекса с иммобилизованным на тест-полоске белком А *Staphylococcus aureus*. Данная методика исключает связывание с маркером иммуноглобулинов сыворотки крови, неспецифических к *M. tuberculosis*, в отличие от традиционной методики, согласно которой все содержащиеся в пробе иммуноглобулины участвуют в реакции с конъюгатом маркера и иммуноглобулин-связывающего белка, а затем вошедшие в состав меченого комплекса специфические антитела взаимодействуют с иммобилизованным антигеном. Предлагаемый подход реализован с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка 38 кДа (Rv0934) *M. tuberculosis*, а в качестве маркера — коллоидного золота. Экспериментально показано, что предложенная методика позволяет увеличить процент выявления сероположительных сывороток с низкой концентрацией антител против возбудителя туберкулеза.

*Ключевые слова:* иммунохроматография, коллоидное золото, серодиагностика, туберкулез.

Проведение эффективной скрининговой диагностики туберкулеза — одна из приоритетных задач здравоохранения. По уровню смертности от инфекционных болезней среди взрослого населения туберкулез занимает одно из первых мест в мире [1]. Для своевременного лечения и предотвращения распространения инфекции необходимы простые и экспрессные методы диагностики туберкулеза [2, 3]. Обнаружение в крови специфических

антител (серодиагностика) является более удобным и быстрым способом диагностики, чем выявление самого возбудителя туберкулеза или его антигенов микробиологическими методами [4], поскольку в серодиагностике тестируемым объектом являются кровь или сыворотка, тогда как при выявлении возбудителя патоген может быть локализован в определенном органе или ткани и не всегда попадает в кровоток. Особенно пер-

Сотников Дмитрий Васильевич, Жердев Анатолий Витальевич, Авдиенко Вадим Григорьевич, Дзантиев Борис Борисович.

*Список сокращений:* БСА — бычий сывороточный альбумин; ИХА — иммунохроматографический анализ; КЗ — коллоидное золото; моноАТ — моноклональные антитела; ОП — оптическая плотность; PBS — фосфатно-буферный ратвор.

\* Авторы для переписки.

спективна для массового использования серодиагностика в формате иммунохроматографического анализа (ИХА), который может проводиться в полевых (внелабораторных) условиях [5, 6].

Общая схема иммунохроматографической серодиагностики заключается в следующем. Тестируемая жидкая проба впитывается мембранами тест-полоски. Перемещаясь вдоль мультимембранного композита, компоненты пробы сначала взаимодействуют с иммуноглобулин-связывающим реагентом (антивидовые антитела, белок А *Staphylococcus aureus*, белок G *Streptococcus* spp. и др.), иммобилизованным на частицах маркера — как правило, на коллоидном золоте (КЗ). Сформировавшийся комплекс вместе с жидкостью попадает на участок мембраны с иммобилизованным антигеном (тестовую, или аналитическую зону), где, взаимодействуя с этим антигеном, образует окрашенную полосу за счет концентрирования цветного маркера. Интенсивность окрашивания аналитической зоны отражает концентрацию специфических антител в пробе и их сродство к антигену.

На данном принципе основаны все коммерчески доступные иммунохроматографические тесты для серодиагностики туберкулеза, например, такие, как «ТВ-Check-1» компании Vedalab (Франция), «One step dBest ТВ» фирмы AmeriTek (США), «Hexagon ТВ» фирмы Human (Германия) и др. Одной из основных причин ложноотрицательных результатов при использовании тестов данного типа является невозможность выявления антител в низких концентрациях. В отличие от иммуноферментного анализа, позволяющего детектировать комплексы, в образовании которых участвуют только специфические иммуноглобулины, а неспецифические после инкубации с антигеном отмываются, в ИХА все взаимодействия проводятся без разделения компонентов. Поскольку с реагентом, связывающим иммуноглобулины, способны взаимодействовать все иммуноглобулины в пробе, а из них только не более 5% приходится на специфические антитела к определенному антигену, то большинство рецепторных молекул на поверхности маркера будет занято молекулами иммуноглобулинов, не способных к связыванию с антигеном. Эта блокировка существенно ограничивает связывание маркера (КЗ) в аналитической зоне, что приводит к снижению чувствительности тестирования и, как следствие, к возрастанию числа ложноотрицательных результатов.

Проведенные исследования имели целью разработку альтернативной методики ИХА, которая позволяет повысить процент выявления сероположительных сывороток, а также характеристи-

ку предложенного подхода в сравнении с традиционной методикой для серодиагностики легочного туберкулеза.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Реактивы.** Использовали рекомбинантный белок А *Staphylococcus aureus* (далее — белок А) (ООО «Имтек», Россия), твин-20, азид натрия (Sigma, США), золотохлористоводородную кислоту (Fluka, Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА) (MP Biomedicals, США), рекомбинантный антиген 38 кДа (Rv0934) *M. tuberculosis* (кат. № AGMTB-0220, Arista Biologicals Inc., США), моноклональные антитела НТМ81 и НТМ61 против рекомбинантных антигенов Rv0934 и Rv2031c *M. tuberculosis*, соответственно (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва). Все использованные соли были российского производства, аналитической или химической чистоты. Воду для приготовления растворов очищали на установке MilliQ (Millipore, США).

**Сыворотки крови больных туберкулезом органов дыхания** с подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза были получены от больных с открытыми формами туберкулеза (инфильтративным, фиброзно-кавернозным и милиарным) из клинических отделений ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва. Для всех сывороток было показано наличие противотуберкулезных антител методом количественного иммуноферментного анализа с использованием наборов «АмерКард Анти-ТУБ-IgG» производства ООО «АмерКард», Москва.

**Сыворотки здоровых доноров** предоставлены ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА, Москва.

**Получение коллоидного золота.** К 97,5 мл кипящей деионизованной воды добавляли 2,95 мл 0,34%-ной золотохлористоводородной кислоты. Смесь кипятили 2 мин при перемешивании. Затем для получения коллоидного золота со средним диаметром частиц 20 и 48 нм добавляли соответственно 1,44 и 0,92 мл 1%-ного раствора цитрата натрия, смесь кипятили при перемешивании в течение 30 мин и охлаждали до комнатной температуры. Полученные препараты хранили при 4° [7].

**Просвечивающая электронная микроскопия.** Препарат коллоидного золота наносили на сетки (300 меш, Pelco International, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Для получения снимков использовали электронный микроскоп CX-100 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 33000. Размеры и форму

частиц на микрофотографиях в цифровой форме анализировали с помощью программы Image Tool (University of Texas Health Science Centre at San Antonio, США) [8].

### **Иммобилизация белка *A. S. aureus* и антигена Rv0934 *M. tuberculosis* на частицах коллоидного золота**

В экспериментах был использован антиген Rv0934 (известный в литературе также как антиген 38 кДа, Ag78, antigen 5, PhoS, PstS1) — периплазматический фосфат-связывающий белок с молекулярной массой 38 кДа, являющийся одним из иммунодоминантных антигенов *M. tuberculosis* [9].

Концентрацию белков, оптимальную для получения стабильных конъюгатов, определяли по флокуляционным кривым — концентрационным зависимостям оптической плотности (ОП) растворов коллоидного золота при  $\lambda$  595 нм в присутствии 10% NaCl [10].

Иммобилизацию проводили согласно [11]. Белки диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ карбонатного буфера, pH 9,0. К коллоидному золоту (ОП<sub>520</sub>=1,0) добавляли 0,1 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> до достижения pH 9,0, а затем белок А или антиген Rv0934 *M. tuberculosis* до конечной концентрации 8 и 20 мкг/мл, соответственно, выбранных на основании флокуляционных кривых. Смесь инкубировали 10 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего добавляли 10%-ный водный раствор БСА до конечной концентрации 0,25%.

Частицы коллоидного золота отделяли от неиммобилизованного белка путем 30-минутного центрифугирования при 6000 g. Осадок ресуспендировали в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, с 0,1 М NaCl (PBS), содержащем 0,25% БСА. При необходимости длительного хранения добавляли NaN<sub>3</sub> до конечной концентрации 0,05%. Препараты конъюгатов хранили при 4°.

**Нанесение реагентов на иммунохроматографические мембраны.** Для нанесения реагентов использовали диспенсер IsoFlow фирмы Imagene Technology (США).

### **Тест-система для определения специфических антител против *M. tuberculosis* с использованием конъюгата коллоидного золота с белком А**

Для формирования аналитической зоны на нитроцеллюлозную мембрану (CNP90, Advan-

ced Microdevices, Индия) наносили препарат антигена Rv0934 *M. tuberculosis* в виде раствора с концентрацией 1,0 мг/мл в дистиллированной воде в количестве 2 мкл на 1 см полосы. Конъюгат коллоидного золота с белком А наносили на подложку для конъюгата (PT-R5, Advanced Microdevices) в разведении, соответствующем ОП<sub>520</sub>=10,0, в объеме 11 мкл на 1 см полосы.

### **Тест-система для определения специфических антител против *M. tuberculosis* с использованием конъюгата коллоидного золота с антигеном 38 кДа *M. tuberculosis***

Для формирования аналитической зоны использовали белок А. На 1 см полосы на мембране CNP90 наносили 2 мкл раствора этого белка (10,0 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4). Конъюгат коллоидного золота с антигеном Rv0934 *M. tuberculosis* наносили на подложку PT-R5 в разведении, соответствующем ОП<sub>520</sub>=2,0, в объеме 8 мкл на 1 см полосы.

**Изготовление иммунохроматографических тест-систем.** После нанесения реагентов мембраны сушили на воздухе при 20—22° не менее 20 ч. Для изготовления иммунохроматографических тест-систем использовали набор mdi Easypack (Advanced Microdevices), включающий рабочую мембрану CNP90, подложку для конъюгата PT-R5, мембрану для нанесения образца FR1(0,6) и конечную адсорбирующую мембрану AP045. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полоски шириной 3,5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (A-Point Technologies, США). Тест-полоски с осушителем силикагелем герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (Wenzhou Dingli Packing Machinery, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20—22° в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при 20—22° [12].

**Имунохроматографический анализ** проводили при комнатной температуре. Одну каплю сыворотки крови наносили в пробирку (Eppendorf, Германия), добавляли туда 3 капли PBS, содержащего 1% твин-20, и вертикально помещали тест-полоску в ту же пробирку. Через 10 мин визуально контролировали результат ИХА. Количественное связывание метки оценивали с помощью портативного видеоцифрового анализатора «Реф-леком» производства ООО «Синтэко-Комплекс» (Россия).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

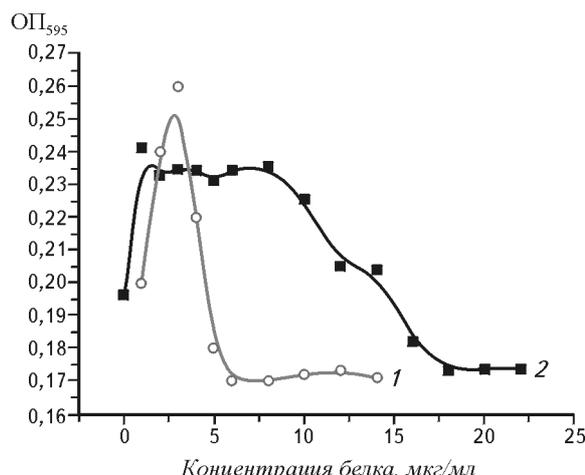
**Синтез конъюгатов белков с коллоидным золотом**

Полученные препараты коллоидного золота по данным электронной микроскопии характеризовались средним (по обеим осям) диаметром частиц около 20 нм и 48 нм (табл. 1).

Для определения концентрации белков, оптимальной для получения стабильных, неагрегирующих конъюгатов с коллоидным золотом, процесс адсорбции контролировали по величине ОП при длине волны 595 нм и добавлении 10%-ного раствора NaCl. Оптимальная концентрация белка для получения конъюгата определяется как концентрация, на 10—15 % превышающая таковую в точке выхода флокуляционной кривой (ОП<sub>595</sub>) на плато, согласно существующим рекомендациям [10]. Исходя из полученных зависимостей (рис. 1) для конъюгатов с препаратом КЗ №1 (средний диаметр 20 нм) были выбраны следующие концентрации: 8 мкг/мл белка А и 20 мкг/мл антигена Rv0934.

**Анализ влияния неспецифических иммуноглобулинов на предел иммунохроматографического выявления антител к антигену Rv0934**

Общий уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови значительно превышает уровень специфических иммуноглобулинов. Для оценки ослабления сигнала при иммунохроматографическом анализе вследствие конкуренции специфических и неспецифических антител за связывание с маркером был проведен модельный опыт. Моноклональные антитела (моноАТ) НТМ81 против антигена Rv0934 в концентрации 10 мкг/мл смешивали с моноАТ, не взаимодействующими с данным антигеном, в соотношении от 1:1 до 1:30, а затем проводили иммунохроматографическое выяв-



**Рис. 1.** Флокуляционные кривые конъюгатов КЗ (средний диаметр 20 нм) с рекомбинантным белком А (1) и с антигеном Rv0934 *M. tuberculosis* (2)

ление специфических антител в полученных растворах с использованием обычных тест-полосок (с КЗ конъюгирован белок А, а в аналитической зоне иммобилизован антиген).

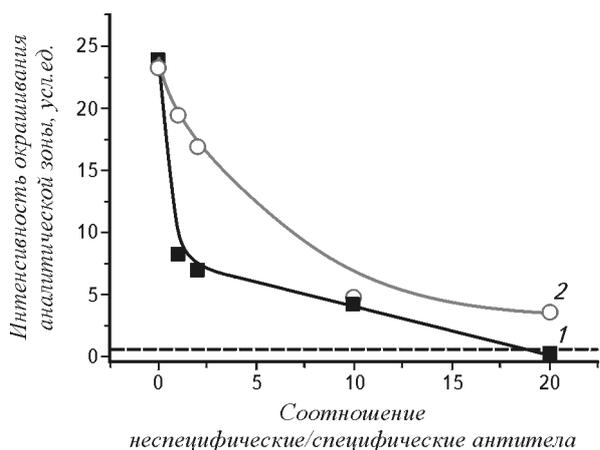
При концентрации конъюгатов КЗ со средним диаметром 20 нм и 48 нм, равной 10<sup>-9</sup> М и 9·10<sup>-11</sup> М (что соответствует ОП≈1), присутствие неспецифических антител, взятых в двукратном избытке по отношению к специфическим, снижает окрашивание аналитической зоны до визуально недетектируемого предела (соответствующего сигналу анализатора «Рефлеком» 0,5 усл. ед.). Увеличение концентрации конъюгата в 3 раза позволяет детектировать специфические антитела в смеси даже при соотношении неспецифических/специфических антител, равном 10:1 — 20:1 (рис. 2).

Несмотря на то, что конъюгат КЗ со средним диаметром 48 нм обеспечивал более низкий предел детекции специфических антител, чем препарат КЗ с диаметром 20 нм, более крупные частицы обладали меньшей стабильностью из-за склонности к агглютинации. Поэтому в дальнейшей работе использовали частицы со средним диаметром 20 нм.

Таблица 1

**Размеры и гомогенность полученных препаратов КЗ — №1 (выборка из 112 частиц) и №2 (выборка из 117 частиц)**

Препарат	Длина большей оси, нм	Длина меньшей оси, нм	Соотношение осей
№ 1	22,8 ± 4,1	18,5 ± 2,9	0,81
№ 2	54,0 ± 7,1	40,1 ± 5,5	0,74

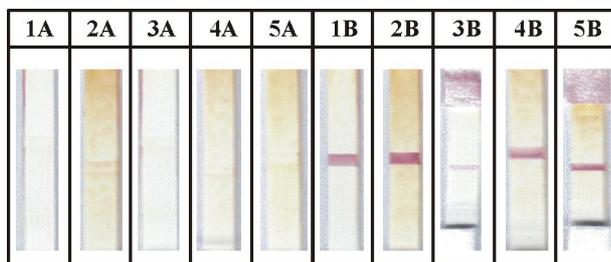


**Рис. 2.** Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны от соотношения специфических и неспецифических антител. Кривые 1 и 2 соответствуют конъюгатам белка А и препаратов КЗ со средним диаметром частиц 20 и 48 нм. Концентрация конъюгатов КЗ со средним диаметром 20 и 48 нм составляет  $3 \cdot 10^{-9}$  М и  $2,7 \cdot 10^{-10}$  М, соответственно (ОП  $\sim 3$ ). Пунктирная линия — предел визуальной детекции окрашивания

### Сравнительная оценка иммунохроматографических тест-систем

Иммунохроматографические тест-системы для серодиагностики *M. tuberculosis* реализовали с помощью двух методик: традиционной, в которой КЗ конъюгирует с белком А, а в аналитической зоне иммобилизуется антиген, и альтернативной, в которой КЗ конъюгирует с антигеном, а в аналитической зоне иммобилизован белок А.

Поскольку в рамках традиционной методики анализа с коллоидным конъюгатом связываются все IgG в пробе, очень малая доля специфических антител участвует в формировании окрашенного комплекса в аналитической зоне. В случае



**Рис. 3.** Тестирование сывороток крови больных туберкулезом (пробы 1—5) по стандартной (А) и альтернативной (В) методике иммунохроматографической серодиагностики. На фотографиях представлены аналитические зоны рабочих мембран тест-полосок

альтернативной методики анализа с КЗ конъюгирует антиген бактерии, поэтому на первой стадии анализа с конъюгатом связываются только специфические антитела в отсутствие конкуренции с другими IgG, что обеспечивает более высокое содержание специфических антител в образовавшемся комплексе.

На основании результатов иммуноферментного серодиагностического исследования, проведенного с использованием наборов «АмерКард Анти-ТУБ-IgG» (ООО «АмерКард»), была сформирована панель из 20 сывороток крови больных легочным туберкулезом с подтвержденным методом ИФА диагнозом. При проведении ИХА по традиционной методике ни одна из 20 сывороток не дала положительного результата тестирования вследствие более высокого предела обнаружения относительно иммуноферментного анализа. Затем данная выборка сывороток была протестирована по альтернативной методике ИХА. Десять из 20 образцов дали положительные результаты тестирования. На рис. 3 представлены примеры тестирования пяти сывороток — внешний вид тест-полосок после проведения ИХА по двум методикам. При анализе сывороток крови 10 здоровых доноров с применением двух методик ложноположительных результатов тестирования не наблюдалось.

Проведенные исследования показали преимущество предложенной нами альтернативной методики иммунохроматографического анализа для серодиагностики туберкулеза. Данная методика, реализованная на примере определения антител против антигена Rv0934 *M. tuberculosis*, увеличила процент выявления сероположительных сывороток у больных с подтвержденным диагнозом. Следует отметить перспективность реализации иммунохроматографической диагностики с использованием данной методики при определении антител к возбудителям различных других заболеваний.

Исследования проведены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 13-04-90479\_Укр\_ф\_а).

Авторы выражают благодарность И.В. Сафенковой (Институт биохимии им. А.Н. Баха) за проведение электронно-микроскопического анализа коллоидного золота и П.Г. Свешникову (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения) за предоставленные моноклональные антитела НТМ81 и НТМ61 против рекомбинантных антигенов *M. tuberculosis*.

Получено 23.01.15

## ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. 2014 — P. 154. ([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/9789241564809\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/9789241564809_eng.pdf)).
2. Van Kampen, S.C. Retooling national TB control programmes (NTPs) with new diagnostics: the NTP perspective / S.C. Van Kampen, A.R. Ramsay, R.M. Anthony, P.R. Klatser // *PLoS One*. — 2010. — V. 5. — e11649.
3. Wallis, R.S. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice / R.S. Wallis, M. Pai, D. Menzies, T.M. Doherty, G. Walzl, M.D. Perkins, A. Zumla // *Lancet*. — 2010. — V. 375. — P. 1920—1937.
4. Долгов В.В., Меньшиков В.В. (ред.) Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в двух томах. Т. 1. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — С. 928.
5. von Lode, P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods // *J. Clin. Biochem.* — 2005. — V. 38. — P. 591—606.
6. Wong, R.C., Tse, H.Y. (Eds.) *Lateral Flow Immunoassay*. — N.Y.: Humana Press, 2009. — P. 224.
7. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* — 1973. — V. 241. — P. 20—22.
8. Safenkova, I.V. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: A case study with potato virus X / I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2012. — V. 403. — P. 1595—1605.
9. Bothamley, G.H. Epitope-specific antibody levels in tuberculosis: Biomarkers of protection, disease, and response to treatment // *Front. Immunol.* — 2014. — V. 5. — Article 243.
10. Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*. — Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2008. — P. 900.
11. Byzova, N.A. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk / N.A. Byzova, E.A. Zvereva, A.V. Zherdev, S.A. Eremin, B.B. Dzantiev // *Talanta*. — 2010. — V. 81. — P. 838—848.
12. Byzova, N.A. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products / N.A. Byzova, E.A. Zvereva, A.V. Zherdev, S.A. Eremin, P.G. Sveshnikov, B.B. Dzantiev // *Anal. Chim. Acta*. — 2011. — V. 701. — P. 209—217.

D.V. SOTNIKOV<sup>1,\*</sup>, A.V. ZHERDEV<sup>1</sup>, V.G. AVDIENKO<sup>2</sup>, and B.B. DZANTIEV<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>The Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre *Fundamentals of Biotechnology*, Russ. Acad. Sci., 119071, Moscow Russia

<sup>2</sup>The Central Tuberculosis Research Institute, Russ. Acad. Med. Sci., 107564, Moscow Russia

e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru  
sotnikov-d-i@mail.ru

### Immunochromatographic Serodiagnosis of Tuberculosis using Colloidal Gold—Antigen Conjugate

A new technique for immunochromatographic serodiagnosis of tuberculosis that is based on the interaction of specific anti-mycobacterial immunoglobulins from blood serum with label—antigen conjugate and subsequent binding of the formed complex with the *Staphylococcus aureus* protein A immobilized on a test-strip has been suggested. Unlike the conventional technique in which all the immunoglobulins in a sample react with the label—immunoglobulin-binding protein conjugate, and then the labeled specific antibodies interact with an immobilized antigen, this technique prevents binding of the label to immunoglobulins that are not specific to *Mycobacterium tuberculosis*. The suggested assay was implemented using the recombinant 38 kDa (Rv0934) protein of *M. tuberculosis* as an antigen and colloidal gold as a label. It was experimentally shown that the proposed technique allows to increase the percentage of detection for seropositive serum with low concentrations of the specific antibodies to the *M. tuberculosis* cause.

*Key words:* colloidal gold, immunochromatography, serodiagnosis, tuberculosis.

---

\* Authors for correspondence.