УДК 541:64:547:96

С.И. Лещук[1], С.М. Попкова[1], Л.В. Сердюк[1], В.В. Анненков[2], Г.В. Юринова[3]

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ ИММУНОДИАГНОСТИКУМОВ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ НОРМАЛЬНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

[1]Институт эпидемиологии и микробиологии ГУ НЦ МЭ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)
[2]Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)
[3]Иркутский государственный университет (Иркутск)

Показаны способы совершенствования диагностических эритроцитарных систем для индикации антибактериальных антител к нормальной микрофлоре человека.

Ключевые слова: *эритроцитарные диагностикумы, бифидобактерии, полимеры, дезинтеграция клеток*

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTIC IMMUNODIAGNOSTICUMS IN DEFINING NORMAL BACTERIAL ANTIBODIES

S.I. Leshuk[1], S.M. Popkova[1], L.V. Serdjuk[1], V.V. Annenkov[2], G.V. Jurinova[3]

[1]Institute of Epidemiology and Microbiology of Scientific Center Of Medical Ecology ESSC RAMS, Irkutsk
[2] Limnological Institute SB RAS, Irkutsk
[3]Irkutsk State University, Irkutsk

Methods of diagnostic erytrocitic systems perfection using for human normal microflora antibacterial antibodies indication are presented.

Key words: *erythrocytic diagnosticums, Bifidobacteria, polymeride, cell desintegration*

Последние десятилетия характеризуются возрастающим вниманием исследователей к микроорганизмам, обитающим в организме человека и животных, и их роли в поддержании здоровья и возникновении болезней.

Микробиологический фенотип, присущий каждому человеку, является показателем иммунологической реактивности организма и одним из факторов естественного иммунитета.

Иммунореактивность к представителям нормальной микрофлоры формируется под влиянием изобилия антигенов, микробных метаболитов, митогенов, супрессоров, адъювантно-активных и прочих веществ и составляет важный компонент иммунологического гомеостаза. Нарушения иммунологических взаимоотношений в системе «макроорганизм – микрофлора», сопровождается выработкой естественных антител против антигенов нормальной микрофлоры, что нередко приводят к развитию патологических состояний, характеризующихся изменением реактивности к представителям индигенной микрофлоры хозяина, как условно-патогенной, так и непатогенной. Антитела к антигенам бифидобактерий ингибируют адгезивную активность этих микроорганизмов в системе *in vitro*. Негативное влияние естественных антител на адгезию бифидобактерий влечет за собой изменение уровня иммунореагирования на индигенные микроорганизмы и может отрицательно влиять на колонизационную резистентность в системе макроорганизма.

Для определения иммунологической реактивности организма к индигенным микроорганизмам необходимо иметь простые в использовании диагностические тест-системы [3, 7]. Наличие таких тест-систем позволит быстро и с высоким уровнем достоверности определять уровень иммунореагирования к бифидобактериям и выявлять группы риска по дисбактериозу [6]. По сочетанию критериев доступности и быстроты получения результатов реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА) с эритроцитарными диагностикумами (ЭД) является наиболее удобным тестом. Поэтому целью нашей работы было конструирование эритроцитарных иммунодиагностикумов на основе фракций бифидобактерий – представителей нормальной кишечной микрофлоры человека [1, 9].

Для выделения фракций бифидобактерий дезинтеграцию клеток проводили на ультразвуковом дезинтеграторе типа UD-20 (Польша) двукратно в течение 2 мин. при 4 °С.

Полученный дезинтеграт суспендировали в 100 мл фосфатного буфера (рН 7,2) и центрифугировали в течение 10 мин. 2 000 об/мин. при 4 °С для осаждения неразрушенных клеток бифидобактерий. Осадок клеточных стенок бифидобактерий получали центрифугированием полученного супернатанта в течение 10 мин. при 8000 об/мин. на лабораторной медицинской центрифуге, суспендировали в 30 мл фосфатного буфера (рН 7,2). Надосадочную жидкость считали цитоплазматической фракцией.

Используя метод ультразвуковой дезинтеграции с последующим дифференциальным центрифугированием, нами были получены две функционально активные клеточные фракции бифидобактерий – фракция клеточных стенок (ФКС) и цитоплазматическая фракция (ЦПФ), на основе которых были изготовлены серии эритроцитарных иммунодиагностикумов.

Трудности при изготовлении эритроцитарных диагностикумов возникают от сложности выбора конъюгирующего (связывающего) агента, способного активизировать один из компонентов [6, 9]. Наиболее часто используемая конъюгация эритроцитов с помощью хлорида хрома, является pH-зависимым процессом, при pH ниже 5 она не развивается. Соотношение белка и хлорида хрома должно быть оптимальным, при избытке антигена и недостатке хлорида хрома сенсибилизация выражена слабо, при относительном избытке $CrCl_3$ отмечается спонтанная агглютинация. Диагностикумы с хлоридом хрома сохраняют свою стабильность в течение трех месяцев при температуре +3 – +6 градусов, затем резко снижается их чувствительность [4].

Чувствительность агглютинационных тестов при выявлении антител может быть повышена путем модификации технологии их изготовления, путем поиска новых реагентов для конъюгирования [2]. Отмечено, что многие синтетические полимеры при взаимодействии с биологическими объектами образуют равновесные комплексные соединения, т.к. обладая активными функциональными группами способны образовывать интерполимерные комплексы с белковыми макромолекулами путем множественных водородных и ионных связей. Учитывая высокую активность полимеров во взаимодействиях с белковыми объектами, была использована возможность их применения в качестве связующих агентов при конструировании эритроцитарных диагностикумов [5, 8].

В связи с этим были проведены исследования по изучению эффективности антигенной сенсибилизации формалинизированных эритроцитов барана с помощью синтетических полимеров: поливинилимидазола (ПВИ), сополимера 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндола, метакриловой кислоты и метилметакрилата (МАК – ВТГИ) и полиметакриловой кислоты (ПМАК) [2, 10].

В проведенных исследованиях выявлялись закономерности, определяющие основные характеристики эритроцитарных иммунодиагностикумов: чувствительность, специфичность, стабильность и воспроизводимость результатов.

В качестве микробных антигенов при конструировании эритроцитарных диагностикумов использовали общие антигены бифидобактерий (коммерческий препарат «Бифидумбактерин») и полученные клеточные фракции бифидобактерий (ФКС и ЦПФ).

Чувствительность эритроцитарного диагностикума во многом зависит от природы конъюгирующего компонента и его концентрации, поэтому нами были выбраны полимеры с различной молекулярной массой и подобраны концентрации, при которых ЭД показали более высокую активность.

В качестве сравнения при изучении эффективности сенсибилизации эритроцитов барана микробными антигенами с помощью полимеров был использован гидрохинон (N-диоксибензол). Выбор этого соединения обусловлен тем, что гидрохинон уже применялся при разработке диагностикума для РПГА с микробным антигеном из нетоксигенного штамма коринебактерий дифтерии (видовой белок 64 КД) для выявления противомикробных (антибактериальных) антител у здорового населения и у носителей *C. diphtheriae*. При этом он показал более высокую чувствительность по сравнению с традиционно используемым таннином (Патент РФ № 2142807 от 23.06.1996).

Чувствительность (активность) приготовленных диагностикумов характеризовали показателем титра специфических антител, которые давали хорошо видимую агглютинацию сенсибилизированных эритроцитов барана.

Результаты испытаний эритроцитарных антигенных диагностикумов, приготовленных с использованием МАК-ВТГИ, ПВИ и гидрохинона, представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 показывают, что эритроцитарные диагностикумы, приготовленные на основе синтетических полимеров более активно выяв-

Таблица 1

Чувствительность эритроцитарных иммунодиагностикумов на основе общих антигенов бифидобактерий в зависимости от вида коньюгирующего компонента

Связывающий компонент, концентрация	Титры антибактериальных антител в РПГА							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Сополимер МАК-ВТГИ (1000 кДа), 0,8 мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+/-
Сополимер МАК-ВТГИ (1000 кДа), 0,04 мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	–
ПВИ (70 кДа), 0,005 мг/мл	++++	++++	++++	–	–	–	–	–
ПВИ (70 кДа), 0,01 мг/мл	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+/-	+/–
Гидрохинон, 0,43% раствор	++++	++++	+/–	–	–	–	–	–

Примечание: «++++» – полная агглютинация; «–» – отсутствие агглютинации; «+/–» – реакция слабо положительная.

ляют специфические антитела, чем диагностикумы с гидрохиноном.

Сополимер МАК-ВТГИ показал высокую активность при снижении концентрации полимера в 20 раз (0,8 мг/мл и 0,04 мг/мл), что можно связать с его химической структурой. Известно, что введение некоторого количества гидрофобных групп в цепь полимера существенно повышает стабильность образующихся на его основе интерполимерных комплексов. В этой связи можно было ожидать увеличения связующих свойств при переходе от ПМАК (для которой наиболее активной является концентрация 0,2 – 0,8 мг/мл) к сополимеру метакриловой кислоты с 1-винил-4,5,6,7-тетрагидроиндолом и метилметакрилатом МАК – ВТГИ при снижении концентрации сополимера.

В случае применения ПВИ в качестве связующего агента при концентрациях 0,04 – 0,8 мг/мл наблюдалась спонтанная агглютинация эритроцитов при замене иммунной сыворотки физиологическим раствором. Понижение концентрации ПВИ от 0,01 до 0,005 мг/мл позволило устранить этот эффект при сохранении высокой активности полимера в качестве связующего агента (табл. 1).

Таким образом, наиболее эффективно сенсибилизация эритроцитов с белковыми антигенами бифидобактерий осуществляется при использовании в качестве конъюгирующих компонентов сополимера МАК – ВТГИ с молекулярной массой 1000 кДа в концентрации 0,04 – 0,8 мг/мл и ПВИ с молекулярной массой 75 кДа в концентрации 0,01 мг/мл.

Для изучения эффективности антигенной сенсибилизации эритроцитов с помощью традиционного связывающего агента хлорида хрома и синтетического полимера полиметакриловой кислоты оценивалась чувствительность приготовленных иммунодиагностикумов на основе общих антигенов бифидобактерий (табл. 2, рис. 1). В качестве исследуемых объектов были использова-

Таблица 2

Сравнительная характеристика диагностикумов на основе полиметакриловой кислоты и хлорида хрома

№ сыворотки	Связывающий агент, концентрация		Кратность увеличения титра
	$CrCl_3$, 0,3%	ПМАК, 0, 8 мг/мл	
	Диагностикум на антитела к общим антигенам бифидобактерий		
	Титры антибактериальных антител		
1	1:8	1:16	2
2	1:8	1:8	1
3	1:16	1:16	1
4	1:8	1:16	2
5	1:8	1:16	2
6	1:2	1:8	4
7	1:2	1:4	2
8	1:8	1:16	2
9	1:32	1:128	4
10	1:8	1:32	4
11	1:16	1:32	2

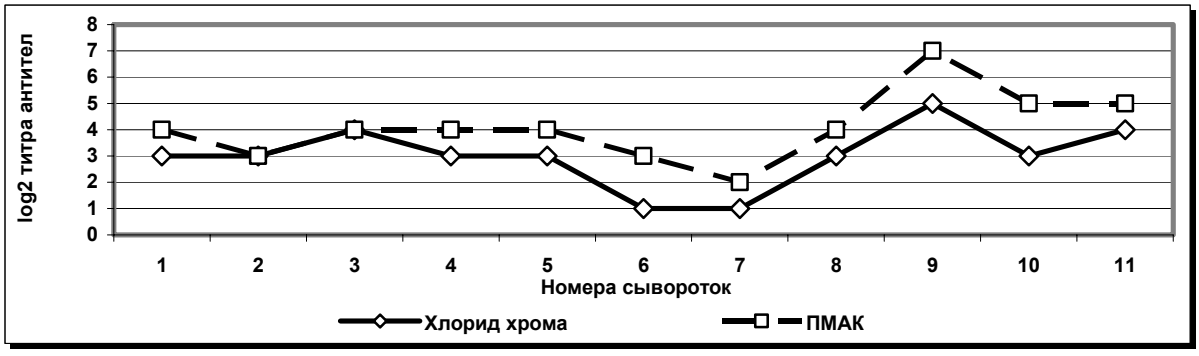

Рис. 1. Сравнительная характеристика диагностикумов на основе ПМАК (полиметакриловой кислоты) (0,8 мг/мл) и хлорида хрома (0,3 %).

ны сыворотки крови детей (от 5 до 14 лет) и взрослых лиц (от 15 до 50 лет).

Из данных таблицы 2 видно, что использование в РПГА диагностикумов, приготовленных с применением слабой полимерной кислоты, позволяет повысить чувствительность к исследуемым антителам в 2 – 4 раза по сравнению с диагностикумами, приготовленными по традиционной методике с использованием хлорида хрома. Не наблюдалось ни одного случая снижения в РПГА титра анализируемой сыворотки при использовании применяемой полимерной кислоты.

Конструирование эритроцитарных диагностикумов проводили и на основе клеточных фракций бифидобактерий (клеточная и цитоплазматическая фракции) и конъюгирующим компонентом ПВИ в концентрации 0,01 мг/мл.

Сравнительную характеристику сконструированных диагностических препаратов, приготовленных на основе антигенов двух клеточных фракций бифидобактерий оценивали по результатам РПГА с иммунными специфическими сыворотками (табл. 3, рис. 2).

По данным таблицы 3 эритроцитарный иммунодиагностикум на основе антигенов фракции

Таблица 3

Сравнительная характеристика тест-систем на основе антигенов клеточных фракций бифидобактерий с применением сополимера ПВИ

№ исследуемой сыворотки	Связывающий агент Сополимер ПВИ (0,01 мг/мл)	
	Диагностикум на антитела	
	на основе антигенов ФКС	на основе антигенов ЦПФ
	Титры антибактериальных антител	
1	1:32	1:8
2	1:32	Отр.
3	1:16	1:16
4	1:32	1:16
5	1:8	Отр.
6	1:8	Отр.
7	1:8	1:4
8	1:8	1:8
9	1:32	1:16
10	1:32	1:32
11	1:16	1:8
12	1:8	1:2
13	1:8	1:8
14	1:8	1:8
$\log_2$	3,9*±0, 39	3,2±0, 32

Примечание: * – показатель $\log_2$ отличается от показателя $\log_2$ второго столбца с достоверностью $p > 0,05$.

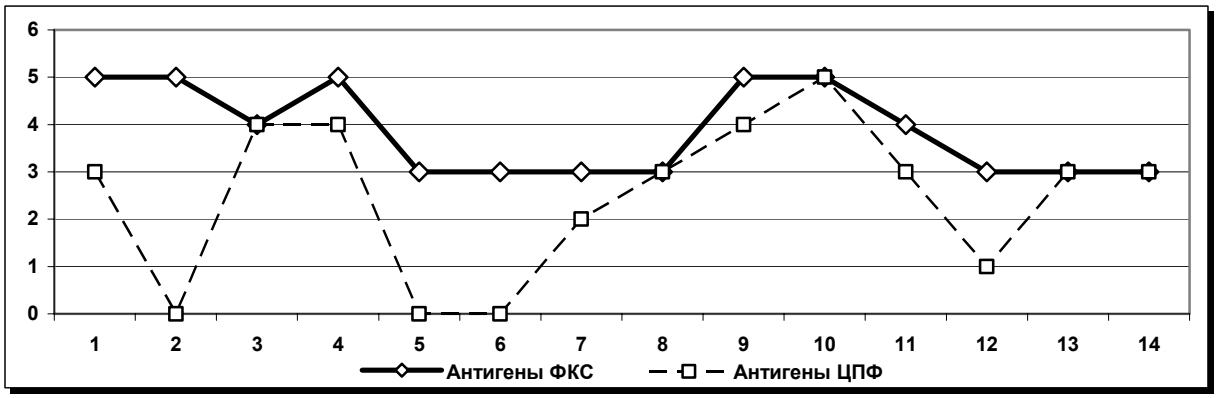

Рис. 2. Сравнительная характеристика диагностикумов на основе антигенов клеточных фракций бифидобактерий с применением ПВИ 0,01 мг/мл.

клеточных стенок выявил высокие титры антител (1 : 32) в большем количестве сывороток (46 %) по сравнению с эритроцитарным иммунодиагностикумом на основе антигенов цитоплазматической фракции, который определил те же титры в 14 % сывороток. Титры антител 1 : 8 — 1 : 32 первый диагностикум выявил в 100 % сывороток, второй — в 64 % сывороток. ЭД на основе цитоплазматической фракции в трех случаях показал отрицательные результаты (отсутствие специфических антител), хотя ЭД на основе антигенов ФКС зафиксировал наличие антител, что характеризует его как более чувствительный.

Далее с помощью сконструированных иммунодиагностикумов на основе трех типов антигенов бифидобактерий определяли наличие антибактериальных антител РПГА в сыворотках 15 доноров крови в возрасте 25—35 лет, сравнительная характеристика их активности представлена в таблице 4 и на рисунке 3.

Анализируя полученные данные таблицы 4, можно сделать заключение, что эритроцитарный

Таблица 4

Сравнительная характеристика диагностикумов на основе антигенов бифидобактерий с применением сополимера ПВИ

№ исследуемой сыворотки	Связывающий агент сополимер ПВИ (0,01 мг/мл)		
	Диагностикум на антитела		
	на основе антигенов ФКС	на основе антигенов ЦПФ	на основе общих антигенов бифидобактрий
	Титры антибактериальных антител		
1	1:4	1:2	1:2
2	1:16	1:2	1:4
3	1:16	1:2	1:4
4	1:16	1:2	1:4
5	1:32	1:4	1:16
6	1:64	1:16	1:2
7	1:32	1:8	1:16
8	1:16	1:8	1:16
9	1:16	1:2	1:2
10	1:16	1:4	1:4
11	1:16	1:2	1:4
12	1:16	1:4	1:4
13	1:32	1:4	1:2
14	1:64	1:2	1:16
15	1:64	1:2	1:16
$\log_2$	$4,46^{*} \pm 0,44$	$1,73 \pm 0,14$	$2,4 \pm 0,22$

Примечание: * – показатель $\log_2$ отличается от показателя $\log_2$ второго и третьего столбца с достоверностью $p \le 0,05$.

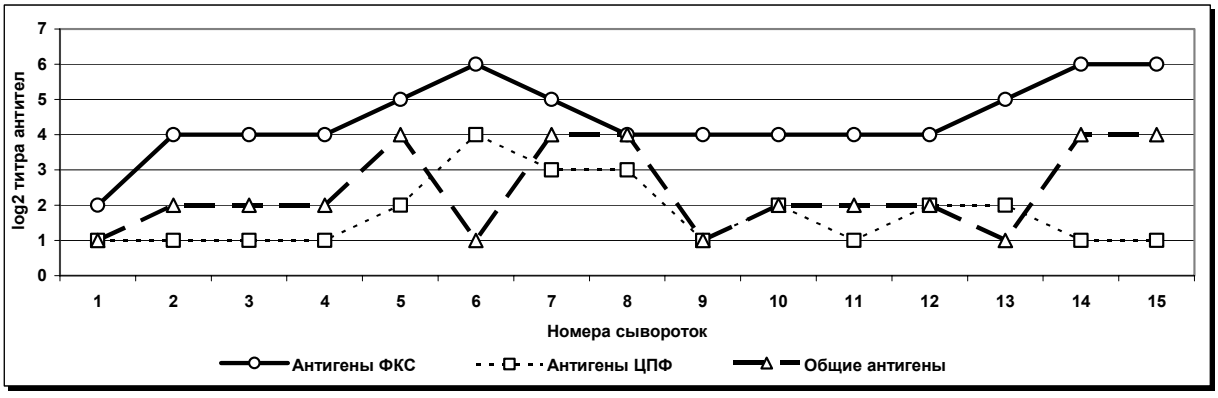

Рис. 3. Сравнительная характеристика диагностикумов на основе антигенов клеточных фракций и общих антигенов бифидобактерий с применением сополимера ПВИ. ФКС – фракция клеточных стенок, ЦПФ – цитоплазматическая фракция.

иммунодиагностикум на основе антигенов клеточной стенки бифидобактерий определяет высокие титры антител (1 : 16 – 1 : 64) в 97 % исследуемых сывороток, эритроцитарный иммунодиагностикум на основе антигенов цитоплазматической фракции – в 15 % сывороток (1 : 16), ЭД на основе общих антигенов бифидобактерий определяет эти же титры антител в 56 % сывороток.

Следовательно, при конструировании эритроцитарных диагностикумов по определению специфических антител к бифидобактериям целесообразно сенсибилизировать эритроциты антигенами клеточных стенок или целыми клетками бифидобактерий. Однако использование в РПГА диагностикума на основе антигенов клеточных стенок бифидобактерий позволяет повысить чувствительность препарата в среднем в 6 раз по сравнению с диагностикумом, приготовленным с использованием целых клеток бифидобактерий.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов нами было установлено, что клеточные фракции бифидобактерий, полученные методом ультразвуковой дезинтеграции, характеризуются более высокой функциональной активностью, чем цельные клетки бифидобактерий. Эритроцитарные иммунодиагностикумы, приготовленные на основе клеточных фракций бифидобактерий и синтезированных полимеров обладают высокой чувствительностью и стабильностью при хранении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Басова Н.Н. Системы серологических реакций, основанных на феномене гемагглютинации / Н.Н. Басова // Мат. Докл. Всероссийской научно-практ. конференции. – Пермь, 1993. – С. 26–27.

2. Действие синтетических полианионов и поликатионов-сополимеров N-винилпирролидона на тучные клетки / И.С. Гущин, В.Г. Войтенко, Б.Д. Свиридов, А.И. Зебрев и др. // Иммунология. – 1988. – № 5. – С. 49–52.

3. Получение эритроцитарного диагностикума на основе стафилококковой протеиназы / Г.К. Дектева, П.Н. Дерябин, Е.В. Беляева, З.В. Шубина // Лаб. дело. – 1991. – № 11. – С. 69–72.

4. Иммуномодулирующий эффект белковых фракций, выделенных из бифидобактерий / Т.Н. Николаева, В.М. Бондаренко, А.И. Николаева, В.В. Зорина и др.// Журн. микробиол. –2004. – № 2. – С. 60–64.

5. Исследование иммуномодулирующей активности имидазолсодержащих полиэлектролитов / В.М. Манько, Т.Б. Руднева, Р.И. Гаджиев, Е.А. Соколова и др. // Иммунология. – 1990. – № 5. – С. 63–66.

6. Каральник Б.В. Научные основы изготовления эритроцитарных диагностикумов / Б.В. Каральник // Журн. микробиол. – 1977. – № 4. – С. 29–33.

7. Каральник Б.В. Эритроцитарные реагенты в клинической иммунологии / Б.В. Каральник // Иммунология. – 1995. – № 6. – С. 4–6.

8. Лещук С.И. Новые подходы к совершенствованию методов иммунохимического анализа с помощью синтетических полимеров для ряда возбудителей инфекционной патологии: Автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.23. – Улан-Удэ, 2002. – 35 с.

9. Сополимеры 1-винилимидазола и акриловой кислоты для биосепарации / Е.Н. Даниловцева, В.В. Анненков, А.И. Михалева, Б.А. Трофимов // Высокомолекулярные соединения. – Серия А. – 2004. – Т. 46, № 2. – С. 1–6.