

## ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

*А.К. Булашев, Ш.С.Серикова,  
А.Х. Жумалин, Д. Кожрахметова*

**Аннотация.** В работе приведены результаты по разработке методов иммунизации кроликов с целью получения антисывороток против *IgG* и *IgM* человека. Установлено, что *IgG* препарат проявляет более высокую иммуногенность при внутривенной инъекции бустерной дозы, чем при подкожном его введении. Тем не менее, антисыворотка, полученная с использованием подкожной бустер-инъекции *IgG*, характеризовалась более высокой специфичностью и позволяла различать *IgG* от *IgM*, тогда как внутривенное введение препарата способствовало усилению синтеза перекрестно-реагирующих антител. Разработанные методы получения поликлональных антител могут быть использованы в развитии отечественной импортозамещающей технологии производства антивидовых конъюгатов для ИФА-наборов.

**Ключевые слова:** *IgG*-человека, *IgM*-человека, иммунизация, антисыворотка, иммуноферментный анализ.

**Введение.** Антитела являются главным реагентом любого иммунологического анализа. Специфичность и аффинность антител во многом определяют объективность результатов диагностических тест-систем. Получение антисыворотки для иммунологических реакций – дело не простое, и успех работы зависит природы и свойств иммуногена, вида используемого адьюванта, схемы иммунизации, способа введения антигена, его оптимальной дозы [1], вида животного [2] и т.д. Следовательно, в каждом конкретном случае перед исследователем встает проблема определения оптимальных условий получения антисывороток (антител) против конкретного антигена, пригодных для иммуноанализа.

Антитела против иммуноглобулинов человека являются основными компонентами иммуноферментного анализа (ИФА), используемого в серологической диагностике ряда инфекционных и инвазионных болезней, в том числе токсоплазмоза [3, 4], сифилиса [5], краснухи [6], цитомегалии [7], герпеса [8] и др., являющиеся причиной тяжелых внутриутробных инфекций. Своевременная диагностика этих болезней имеет первостепенное значение в профилактике мертворождений, аборт, ранней детской смертности, слепоты и инвалидности детей. На рынке медицинских препаратов для серодиагностики этой группы болезней имеется ряд коммерческих тест-систем, основанные на определении *IgG* и *IgM* антител к различным антигенам возбудителя в

сыворотке крови. Результаты этих диагностикумов основываются на общеизвестном механизме образования двух основных классов иммуноглобулинов и трактуются следующим образом: 1)  $+IgG$ ,  $-IgM$  – здоровое носительство; 2)  $-IgG$ ,  $+IgM$  либо  $+IgG$ ,  $+IgM$  – первичное инфицирование, острое или субклиническое течение (возможно внутриутробное инфицирование); 3)  $-IgG$ ,  $-IgM$  – отсутствие инфекции.

В настоящее время особую актуальность приобретает своевременная диагностика токсоплазмоза. По данным J.M.Wastling and J.G.Mattsson в Европе и Северной Америке распространенность токсоплазмоза колеблется в пределах от 20 до 80% [9]. Инфицированность токсоплазмой населения Российской Федерации в среднем составляет около 20,0% (<http://www.lvrach.ru/2011/11/15435295>), а в нашей стране более 77% людей страдает от токсоплазмоза ([www.agrodom.kz/98-opasnost-protzojnykh-boleznej.html](http://www.agrodom.kz/98-opasnost-protzojnykh-boleznej.html)). Для эффективной борьбы с этой инвазией необходимо проводить массовый диагностический скрининг населения, в первую очередь женщин. К сожалению, Казахстан не производит тест-системы для диагностики вышеназванных болезней, поэтому высокая стоимость импортных диагностикумов делает их недоступными для широкого круга населения.

Целью работы явилось разработка методов получения антител против  $IgG$  и  $IgM$  человека, которые могут быть использованы в создании технологии производства отечественных ИФА-наборов.

#### **Материалы и методы исследований**

В работе были использованы кролики породы советская шиншилла. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с требованиями «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» в виварий АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина». Комбикорма и вода лабораторным животным давались *ad libitum*.

*Выделение, очистка  $IgG$  и  $IgM$  человека.* Выделение иммуноглобулиновой фракции из сыворотки крови проводили с помощью общеизвестного метода осаждения сульфатом аммония. Исходным материалом служили сыворотки крови людей, любезно представленные сотрудниками Железнодорожной поликлиники г.Астана с согласия пациентов.

*Очистку  $IgG$  человека* проводили с помощью метода ионообменной хроматографии на ДЭАЭ сефадексе А-50 известным способом [10]. Степень чистоты препарата определяли с помощью гель-фильтрационной хроматографии на сефадексе G-100 и S-200, используя колонку длиной 38 см., объемом 30 см, диаметром 1,5 см. В качестве элюирующего буфера использовали забуференный физиологический раствор (ЗФР). Для получения препарата  $IgM$  был использован метод, описанный Кэтти Д. и соавт. (1991) [11].

*Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (ДСН).* Чистоту  $IgG$  человека подтверждали с помощью электрофореза в 12% ПААГ-ДСН по общепринятой методике. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым голубым R-250 (Sigma). Молекулярная масса белков была

определена с помощью программного обеспечения Photo-Capt Version 12.4 компании "VILBER LOURMAT".

*Методика проведения инъекции животным.* Кроликов иммунизировали подкожно и внутривенно, вводя *IgG* человека в количестве 4 мг и 0,2 мг, соответственно. Для получения анти-*IgM* аликвоту иммуноглобулина в количестве 1 мг вводили подкожно и внутримышечно. Подкожные и внутримышечные инъекции осуществляли в 4 точки вдоль хребта с обеих сторон, вводя препарат в объеме 0,5 мл в каждую точку. В качестве иммуностимулятора использовали полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и неполный адъювант Фрейнда (НАФ). Внутривенные инъекции проводили, вводя иммуноген в объеме 0,1 мл в краевую ушную вену.

*Забор крови у экспериментальных животных и хранение антисывороток.* Забор крови у кроликов, иммунизированных *IgG* человека, осуществляли после последней подкожной или внутривенной инъекции на 7 день или на 3 день, соответственно. Взятие крови у кроликов, иммунизированных *IgM* человека, осуществляли через неделю после последней иммунизации. Кровь забирали из краевой ушной вены в объеме 10-20 мл. Полученную кровь выдерживали в термостате при 37°C в течение 1 ч., далее в холодильнике при 4°C на протяжении одной суток. Образовавшуюся сыворотку отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Сыворотки хранили при -20°C в смеси с равным объемом глицерина.

*Тестирование антисывороток непрямом методом ИФА.* Определение титров полученных антисывороток проводили по стандартной методике непрямого варианта ИФА с использованием полистирольных 96-луночных плоскодонных планшетов для ИФА (Nunc, Дания). Лунки планшеты были сенсibilизированы полученными препаратами *IgG* и *IgM* и/или их коммерческими аналогами в концентрации 0,005 мг/мл, при 4°C в течение ночи. Образцы антисывороток иммунных кроликов в количестве 0,1 мл раститровывали в трех рядах планшеты, начиная с разведения 1:100 и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. Иммунный комплекс выявляли с помощью антивидового конъюгата (Sigma, США) и его субстрата - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Sigma, США). Для отмывки твердой фазы от не связавшихся компонентов реакции планшет отмывали 3 раза ЗФР и 3 раза ЗФР с твином. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (ASYS Expert 96, Австрия) при длине волны 492 нм. За титр антисыворотки брали показатель экстинции, который в два и более раз превышает максимальное значение оптической плотности (ОП) лунки, в которой раститровывалась сыворотка кролика, полученная до иммунизации.

Степень чистоты препарата *IgG* определялась с помощью непрямого ИФА. Для этой цели лунки двух рядов 96-луночного планшета для иммунологических реакции сенсibilизировали приготовленным препаратом *IgG*, начиная с концентрации 10 мкг/мл в ЗФР. Лунки следующих рядов покрывали аналогичным образом препаратом *IgG* (Sigma-Aldrich) и *IgM* (Sigma-Aldrich). Свободные участки твердой фазы блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 1 часа. После отмывки планшеты в

лунки вносили конъюгаты *anti-human IgG* (Jackson ImmunoResearch Laboratories) и *anti-human IgM* (Sigma Aldrich). Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света при длине волны 492 нм.

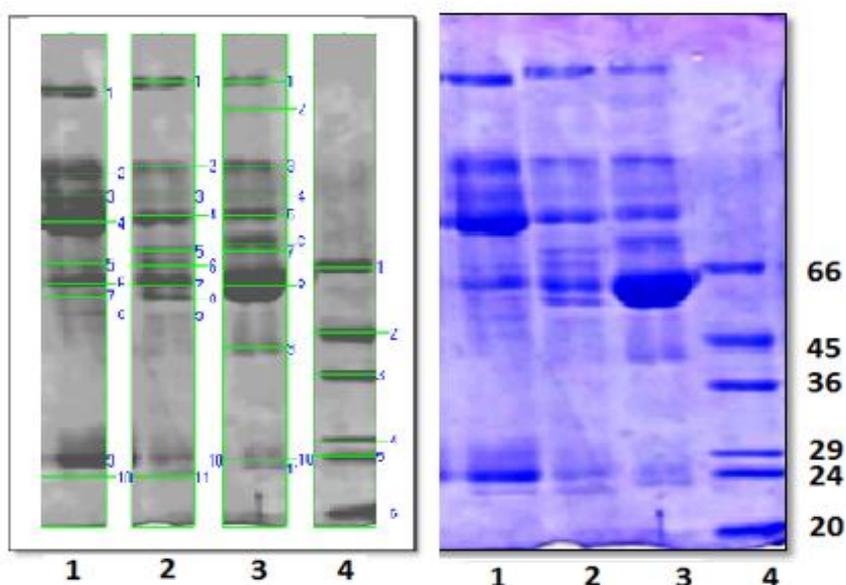
Статистическая обработка титров антисывороток проводилась по методике, описанной Т.С.Сайдулдином (1981) [12].

Выделение из антисыворотки кроликов иммуноглобулинов G класса проводили с помощью метода ионообменной хроматографии на ДЭАЭ сефадексе А-50.

### Результаты исследований

Из 100 мл сыворотки человека методом сульфат-аммонийного осаждения и хроматографии на анионообменнике ДЭАЭ сефадексе А-50 было получено 80,0 мл очищенного *IgG* с концентрацией белка 0,125 мг/мл, т.е. выход *IgG* из 1,0 мл нормальной сыворотки человека составил 0,1 мг. Раствор препарата концентрировали с помощью ПЭГ-6000 до содержания в нем белка 1мг/мл.

Результаты электрофорез препарата *IgG* в 12,5% ПААГ-ДСН показаны в рисунке 1. и в таблице 1.



1-*IgG* после очистки ДЭАЭ-сефадексе А-50; 2-Препарат *IgG* после осаждение сульфатом аммония; 3- сыворотка человека нормальная; 4- маркерные белки

Рисунок 1 – Электрофореграмма иммуноглобулиновых препаратов

Таблица 1 – Молекулярная масса белков по программе Photo-Capt Version 12.4

Мол.м	Линия 1	Линия 2	Линия 3	Линия 4	Линия 5
	2	3	4	5	6
Полоса 1	134.526	120.895	124.211	124.211	66.000
Полоса 2	124.579	95.474	97.684	115.737	45.000
Полоса 3	95.842	88.474	88.474	97.684	36.000
Полоса 4	88.474	79.632	82.211	88.474	29.000
Полоса 5	80.000	66.737	70.789	82.211	24.000

Полоса 6	71.526	60.841	66.368	73.737	20.000
Полоса 7	60.841	55.803	60.055	70.789	
Полоса 8	23.180	50.301	55.047	60.055	
Полоса 9		23.180	49.950	41.512	
Полоса 10		20.708	23.180	23.441	
Полоса 11			20.708	21.689	

Как видно из рисунка 1 и таблицы 1, анализ электрофореграммы *IgG* с помощью программного обеспечения Photo-Capt Version 12.4 компании "VILBER LOURMAT" позволил выявить до 11 электрофоретических полос глобулярных белков всех главных зон ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$  и  $\gamma$ -глобулины) с мол.м. от 20,7 до 134,5 кД. Молекула *IgG* разделилась на две белковые полосы с мол.м. 60,8 и 23,2 кД. Очистка иммуноглобулинов на ДЭАЭ-сефадексе А-50 после сульфат-аммонийного высаливания позволила исключить белковые полосы с мол.м. 70,7 кД; 66,6 кД и 55,0 кД, расположенных в районе тяжелой цепи *IgG*, и получить ярко выраженную полосу легкой цепи *IgG*.

Результаты определения степени чистоты препарата *IgG* (далее *IgG* НИИСХБ) от других классов иммуноглобулинов, в первую очередь от *IgM*, приведены в таблице 2.

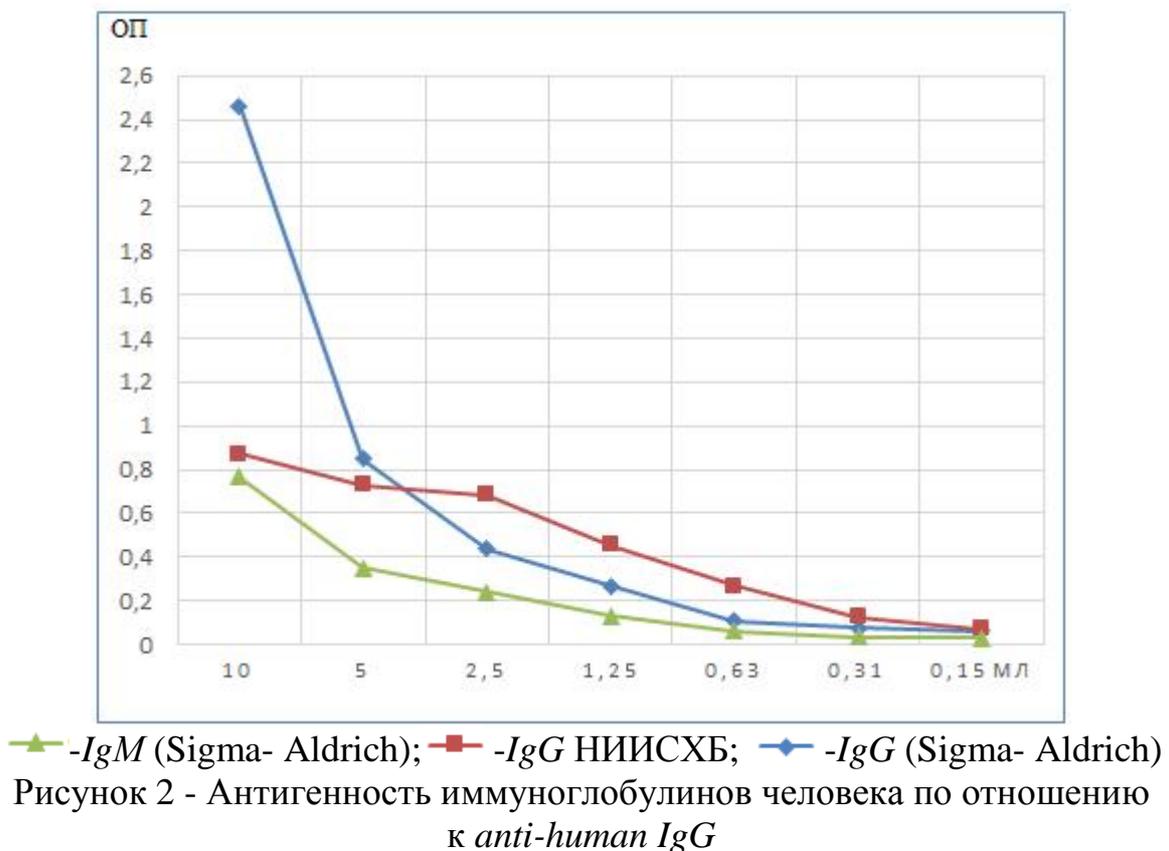
Таблица 2 – Специфичность *anti-human IgG* и *anti-human IgM* конъюгатов по отношению к полученным *IgG* в непрямом ИФА

Концентрация иммуноглобулинов	ОП лунок, сенсibilизированных иммуноглобулином					
	<i>IgG</i> Sigma-Aldrich	<i>IgG</i> НИИ СХБ	<i>IgM</i> Sigma-Aldrich	<i>IgG</i> Sigma-Aldrich	<i>IgG</i> НИИ СХБ	<i>IgM</i> Sigma-Aldrich
	Конъюгат <i>anti-human IgG</i>			Конъюгат <i>anti-human IgM</i>		
1	2	3	4	5	6	7
10 мкг/мл	2,461	0,869	0,765	0,008	0,009	0,815
5 мкг/мл	0,846	0,729	0,349	0,012	0,011	0,526
2,5 мкг/мл	0,436	0,685	0,239	0,011	0,010	0,0403
1,25 мкг/мл	0,268	0,455	0,129	0,009	0,011	0,285
0,63 мкг/мл	0,105	0,268	0,061	0,011	0,010	0,157
0,31 мкг/мл	0,074	0,124	0,035	0,004	0,013	0,076
0,15 мкг/мл	0,063	0,072	0,028	0,012	0,011	0,037
контроль	0,000	0,001	0,001	0,000	0,003	0,001
Примечание - Постановку ИФА проводили в пяти повторах. В таблице приведены средние величины ОП.						

Из таблицы 2 следует, что приготовленный препарат иммуноглобулина свободен от *IgM*, что подтверждается отсутствием реакции с козьими поликлональными *anti-human IgM* (Sigma Aldrich), который по спецификации

производителя аффинно очищен и имеет специфичность к  $\mu$ -цепи иммуноглобулина. Однако, козы поликлональные *anti-human IgG* (Jackson Immuno Research Laboratories) антитела вступали в перекрестную реакцию с *IgM*. Это свойство связано с характеристикой данного конъюгата. Так, по спецификации производителя он реагирует с антигенами легкой цепи, которые являются общими для большинства иммуноглобулинов человека. Кроме того, производитель не исключает кросс-реакцию конъюгата с иммуноглобулинами других видов.

Следует отметить, что фирменный препарат показал свою высокую антигенность при концентрациях 10,0 мкг/мл и 5,0 мкг/мл (рис.2).



ОП лунок с указанными концентрациями *IgG* была выше показателей экстинции лунок, сенсibilизированных *IgM*, соответственно в 3,2 и 2,4 раза. Однако, по мере уменьшения содержания иммуноглобулинов на твердой фазе увеличивалась антигенность *IgG* НИИСХБ по отношению к *anti-human IgG*. Так, например, значения ОП лунок, сенсibilизированных *IgG* НИИСХБ в количестве 2,5; 1,25; 0,63; 0,31 и 0,15 мкг/мл, были выше показателей ОП лунок, покрытых *IgM*, в 2,9; 3,5; 4,4; 3,5; и 2,6 раза, соответственно.

Приготовленный препарат *IgG* человека был использован для получения класс-специфичных антивидовых антител. Для этой цели нами были разработаны следующие методы иммунизации (таблица 3).

Таблица 3 – Методы иммунизации кроликов для получения антисывороток против *IgG* человека

Метод иммунизации	Вид антигена	Дни иммунизации				Дни забора крови	
		1-ый	14-ый	28-ой	35-ый	38 ой	42 ой
Первый	<i>IgG</i> НИИСХБ	Способы введения и дозы антигена				-	-
		4-х местах подкожно в области живота и внутримышечно в верхнюю часть бедра			подкожно	-	+
		2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +ПАФ	2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +НАФ	2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +НАФ	1,0 мг <i>IgG</i> без адьюванта		
Второй	<i>IgG</i> НИИСХБ	Способ введения антигена					
		4-х местах подкожно в области живота и внутримышечно в верхнюю часть бедра			внутри-венно	+	-
		2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +ПАФ	2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +НАФ	2,0 мл <i>IgG</i> в ЗФР(2,0 г/мл) +НАФ	0,2 мг <i>IgG</i> без адьюванта		
Третий	<i>IgG</i> Sigma- Aldrich	Иммунизация проводилась по второму методу					

Расход *IgG* человека при первом методе иммунизации составил 7,0 мг., а продолжительность иммунизации была равна 42 дням. Второй метод иммунизации длился 38 дней, при этом было израсходовано 6,2 мг. антигена.

Перед определением титра антисывороток проводилось определение оптимальной концентрации *IgG*, необходимой для покрытия твердой фазы полистиролового планшета при постановке непрямого ИФА (таблица 4).

Таблица 4- Показатели оптической плотности лунок, сенсibilизированных различной концентрацией *IgG* человека, в непрямом ИФА

№ лунок	Разведение анти-сыворотки	Концентрация препарата <i>IgG</i> , мкг/мл					
		10,0	5,0	2,0	1,0	0,5	0,25
		Средние значения ОП жидкости лунок					
1	50×2	2,164	1,589	1,857	1,471	1,051	0,675

2	$50 \times 2^2$	2,307	1,527	1,694	1,116	1,064	0,701
3	$50 \times 2^3$	2,459	1,367	1,598	1,227	0,977	0,736
4	$50 \times 2^4$	2,579	1,343	1,805	1,091	0,941	0,677
5	$50 \times 2^5$	2,387	1,261	1,613	1,063	0,803	0,597
6	$50 \times 2^6$	2,397	1,184	1,695	1,255	0,876	0,444
7	$50 \times 2^7$	2,325	1,033	1,611	1,226	0,767	0,492
8	$50 \times 2^8$	2,168	1,065	1,702	1,243	0,826	0,498
9	$50 \times 2^9$	2,026	1,020	1,658	1,101	1,115	0,574
10	$50 \times 2^{10}$	1,804	0,699	1,187	0,841	0,616	0,475
11	$50 \times 2^{11}$	1,001	0,376	0,870	0,542	0,497	0,393
12	$50 \times 2^{12}$	1,050	0,232	0,743	0,458	0,342	0,422
13	$50 \times 2^{13}$	0,628	0,110	0,631	0,432	0,323	0,447
14	$50 \times 2^{14}$	0,353	0,055	0,530	0,360	0,287	0,352
15	$50 \times 2^{15}$	0,240	0,050	0,300	0,210	0,090	0,150
16	$50 \times 2^{16}$	0,200	0,046	0,158	0,080	0,037	0,030

**Примечания**

1. Антисыворотка раститровывалась в лунках с определенной концентрацией иммуноглобулина в пяти повторах; в таблице даны средние значения ОП

2. Средний показатель ОП жидкости лунок с сывороткой крови кроликов до иммунизации в разведении 1:100 был равен 0,161

Из данных таблицы 4 видно, что наиболее оптимальной концентрацией *IgG*, необходимой для сенсibilизации лунок планшета, является 2,0 мкг/мл. Дальнейшее уменьшение количества иммуноглобулинов приводило к ослаблению интенсивности окрашивания реакционной жидкости, хотя при этом чувствительность ИФА оставалась неизменной, что позволяла выявлять специфические антитела до титра антисыворотки  $50 \times 2^{14}$ .

Титры антисывороток кроликов, гипериммунизированных иммуноглобулиновыми препаратами, показаны в таблице 5.

Таблица 5 – Активность кроличьих антисывороток против *IgG* человека в непрямом ИФА

Титр антисывороток	Первый метод иммунизации		Второй метод иммунизации		Третий метод иммунизации	
	ОП реакционной жидкости, 492 нм					
	до иммуни	после иммуни-	до иммуни-	после иммуни-	до иммуни-	после иммуни-

	-зации	зации	зации	зации	зации	зации
1	2	3	4	5	6	7
$50 \times 2$	0,282	3,509	0,103	3,577	0,318	3,595
$50 \times 2^2$	0,140	3,598	0,064	3,582	0,148	3,484
$50 \times 2^3$	0,302	3,431	0,049	3,423	0,088	3,421
$50 \times 2^4$	0,195	3,593	0,036	3,531	0,068	3,602
$50 \times 2^5$	0,130	3,581	0,030	3,612	0,053	3,713
$50 \times 2^6$	0,080	3,658	0,026	3,632	0,036	3,582
$50 \times 2^7$	0,067	3,706	0,023	3,789	0,048	3,718
$50 \times 2^8$	0,082	3,504	0,016	3,598	0,052	3,520
$50 \times 2^9$		3,245		3,428		3,522
$50 \times 2^{10}$		2,861		3,455		3,439
$50 \times 2^{11}$		2,125		3,083		3,439
$50 \times 2^{12}$		1,405		2,759		3,485
$50 \times 2^{13}$		<b>0,770</b>		1,908		3,277
$50 \times 2^{14}$		0,469		1,148		2,864
$50 \times 2^{15}$		0,258		0,743		2,190
$50 \times 2^{16}$		0,195		0,492		1,417
$50 \times 2^{17}$		0,102		<b>0,242</b>		<b>0,677</b>
$50 \times 2^{18}$		0,234		0,162		0,516
$50 \times 2^{19}$		0,063		0,111		0,329
$50 \times 2^{20}$		0,066		0,084		0,239
$50 \times 2^{21}$		0,057		0,071		0,224
$50 \times 2^{22}$		0,052		0,062		0,175
$50 \times 2^{23}$		0,056		0,066		0,176
$50 \times 2^{24}$		0,067		0,082		0,181

Примечание - антисыворотки раститровывались в лунках, покрытых IgG в трех повторах; в таблице даны средние значения ОП

Из таблицы 5 видно, что приготовленный нами препарат IgG человека показал относительно большую иммуногенность при использовании второго метода иммунизации. Причем, по иммуногенности он не уступал своему коммерческому аналогу (третий метод иммунизации). Так, антитела против IgG человека против обоих видов иммуноглобулинов обнаруживались до титра  $50 \times 2^{17}$ , тогда как титр антисыворотки, полученной по первому методу не превышал  $50 \times 2^{13}$ .

Антисыворотки, полученные сравниваемыми методами, по своей активности в ИФА не отличались между собой до титра  $50 \times 2^9$  (рис.3).

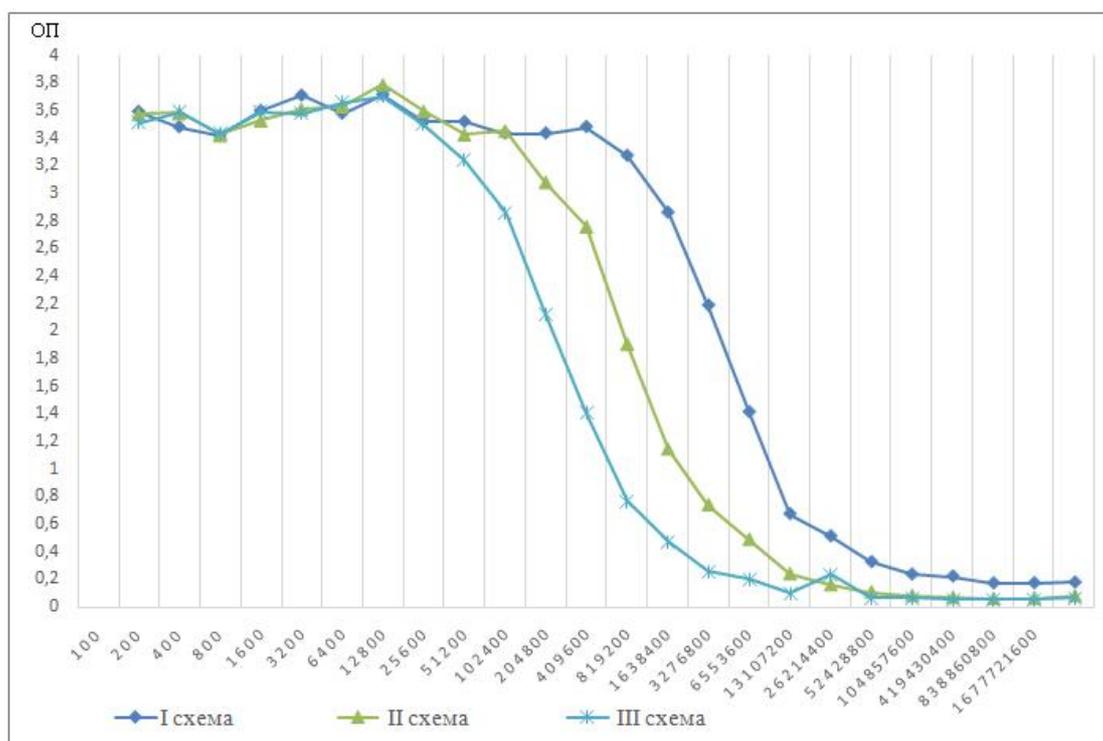


Рисунок 3 – Активность анти-IgG сывороток при различных схемах иммунизации

Заметная разница между первым и вторым методом иммунизации, с одной стороны, и третьим методом, с другой стороны, имела место начиная с разведения сывороток  $50 \times 2^{10}$ , а с титра  $50 \times 2^{11}$  реакционная жидкость более интенсивно окрашивалась в лунках, в которых раститровалась антисыворотка, полученная по третьей схеме.

С целью определения степени специфичности антивидовых антител каждая антисыворотка была протестирована в ИФА против IgG-, и IgM-человека в пяти повторах. Полученные титры были подвергнуты статистической обработке и представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Специфичность антисывороток кроликов, иммунизированных IgG препаратами, в непрямом ИФА

Метод иммунизации	Титр антител в непрямом ИФА против		Критерий Стьюдента (t)	Достоверность разницы (P)
	IgG человека	IgM человека		
Первый метод	1: 540 470 (+9,3%; -8,5%)	1:50 500 (+9,3%; -8,5%)	4,0	P<0,01
Второй метод	1: 1 080 940 (+10,2%; -9,3%)	1:204 400 (+12,5%; -11,3%)	2,9	P<0,05
Третий метод	1:713 160 (+11,7%; -10,4%)	1: 1 638 400 (+20,6%; -17,1%)	0,9	P>0,05

Результаты статистической обработки титров антител гипериммунных сывороток показали, что внутривенное введение бустерной дозы антигена

(второй и третий методы) вызывает более выраженный иммунный ответ, чем подкожная инъекция (первый метод иммунизации). Например, при подкожной бустеризации средний титр специфических антител был равен 1:540 470 (+9,3%; -8,5%), тогда как инъекция приготовленного нами иммуноглобулина и его коммерческого аналога в краевую вену уха позволила получить антисыворотки с более высокими титрами 1: 1 080 940 ( $t=5,26$ ;  $P<0,01$ ) и 1:713 160 ( $t=2,0$ ;  $P<0,05$ ), соответственно. Тем не менее, наибольшую специфичность показала антисыворотка, полученная по первому методу. Так, подкожная бустеризация позволила получить антисыворотку против *IgG* человека, которая в разведении выше 1:50 500 позволяла дифференцировать этот класс иммуноглобулина от *IgM*, в то время внутривенное введение бустерной дозы *IgG* (второй метод) и его фирменного аналога (третий метод) приводило к существенному увеличению кросс-реактивности антител по отношению к *IgM*. Как видно из таблицы 6, если антисыворотка против *IgG* НИИСХБ перекрестно реагировала с *IgM* человека до титра 1:204 400 (+12,5%;-11,3%), то иммунизация кролика его коммерческим аналогом приводила к получению антител, реагирующих в одинаковой степени с использованными классами иммуноглобулинов.

Для получения антител против *IgM* человека нами была разработана следующая схема иммунизации. Аликвоту *IgM* в количестве 1,0 мл с концентрацией белка 1 мг/мл смешивали с 1,0 мл ПАФ и вводили ее кролику подкожно и внутримышечно в 4-х местах. Далее, трижды с интервалом в один месяц повторяли иммунизацию, вводя дважды по 0,5мг иммуноглобулина в НАФ и последний раз 0,1 мг антигена в ЗФР. Через неделю после последней инъекции *IgM* производили забор крови.

Сыворотки кроликов, иммунизированные против *IgM* и *IgG* человека, были протестированы на титр антител против гомологичного и гетерологичного антигенов (таблица 7).

Таблица 7 – Специфичность антисывороток кроликов, иммунизированных *IgM* и *IgG* препаратами, в непрямом ИФА

Титр антисывороток	Вид антисывороток			
	анти- <i>IgM</i>	анти- <i>IgG</i>	анти- <i>IgM</i>	анти- <i>IgG</i>
	Виды иммуноглобулинов, иммобилизованных на твердой фазе			
	<i>IgG</i> (Sigma)		<i>IgM</i> (Sigma)	
Значение оптической плотности реакционной жидкости, 492 нм				
1	2	3	4	5
50×2	0,940	2,026	1,030	0,654
50×2 <sup>2</sup>	0,920	1,957	0,941	0,605
50×2 <sup>3</sup>	0,724	2,044	0,586	0,563
50×2 <sup>4</sup>	0,426	1,859	0,462	0,515
50×2 <sup>5</sup>	<b>0,231</b>	1,945	0,183	0,466
50×2 <sup>6</sup>	0,138	1,797	0,163	0,484
50×2 <sup>7</sup>	0,123	1,836	0,109	0,489

$50 \times 2^8$	0,177	1,977	<b>0,153</b>	0,555
$50 \times 2^9$	0,095	1,917	0,081	0,482
$50 \times 2^{10}$	0,054	1,547	0,043	0,379
$50 \times 2^{11}$	0,089	1,341	0,025	<b>0,257</b>
$50 \times 2^{12}$	0,045	0,885	0,021	0,142
$50 \times 2^{13}$	0,024	0,546	0,013	0,086
$50 \times 2^{14}$	0,056	<b>0,322</b>	0,006	0,047
СКН	0,115	0,160	0,075	0,125

#### Примечания

1 Каждая из антисывороток была проверена на специфичность по отношению к *IgG* и *IgM* в пяти повторях; в таблице даны средние показатели оптической плотности

2 СКН – Сыворотка кроличья негативная

Результаты ИФА показывают, что антисыворотка против *IgM* вступает в связь с гомологичным иммуноглобулином до титра  $50 \times 2^8$ , тогда как положительная реакция по отношению к *IgG* отмечалась до разведения  $50 \times 2^5$ . Титры анти-*IgG* сыворотки против гомологичного иммуноглобулина по сравнению с *IgM* также были выше на три порядка ( $50 \times 2^{14}$  и  $50 \times 2^{11}$ , соответственно).

*IgG*-фракция антисывороток против *IgG* и *IgM* человека была очищена методом хроматографии на ДЭАЭ сефадекс А-50. В процессе хроматографии данный класс иммуноглобулина элюировалась в виде трех пиков. Практический выход *IgG* в результате очистки сывороток кролика составил 65%. Элюаты упомянутых пиков были протестированы на активность по отношению к использованным иммуноглобулинам человека с использованием конъюгата против *IgG* кролика в ИФА. Результаты анализа показали, что все три пика содержат антитела *IgG* класса, специфичные к *IgG* или *IgM* человека.

#### Обсуждение результатов и заключение

Методологические подходы, использованные нами для выделения *IgG* человека, позволили получить иммуноглобулины данного класса с достаточной степенью чистоты. По антигенности приготовленный препарат не уступал своему коммерческому аналогу. Важно отметить, что коммерческий *anti-human IgG* конъюгат при оптимальной концентрации иммуноглобулинов на твердой фазе лучше связывался с препаратом НИИСХБ, и тем самым более отчетливо дифференцировал два вида иммуноглобулинов.

Метод получения анти-*IgG* сыворотки при котором бустерная доза антигена вводилась внутривенно оказался более эффективным, чем при подкожном его введении. Причем, иммуногенность приготовленного *IgG* была на таком же высоком уровне, как у *IgG* (Sigma-Aldrich). Однако, следует подчеркнуть, что антисыворотка, полученная после подкожной инъекции бустерной дозы, характеризовалась более высокой специфичностью и позволяла различать *IgG* от *IgM*, тогда как внутривенное введение бустерной дозы обоих видов *IgG* вызвала активизацию кросс-реактивности антител по

отношению к *IgM*. Видимо, поступление в кровотоки высокой концентрации антигена вызывает усиленный синтез антител с низкой авидностью, что было зарегистрировано на третий день после введения бустерной дозы. Схема иммунизации кроликов *IgM* человека также позволила получить антисыворотку, которая в непрямом ИФА позволяет дифференцировать *IgM* от *IgG*.

Полученные результаты позволяют сделать следующее заключение:

- приготовлен очищенный препарат *IgG*, который по своей антигенности и специфичности не уступает коммерческому аналогу (Sigma-Aldrich);
- разработаны методы иммунизации кроликов с целью получения антисывороток против *IgG* и *IgM* человека;
- *IgG* препарат проявляет более высокую иммуногенность при внутривенной инъекции бустерной дозы, чем при подкожном его введении;
- антисыворотка, полученная с использованием подкожной бустер-инъекции *IgG*, характеризуется более высокой специфичностью и позволяет различать *IgG* от *IgM*, тогда как внутривенное введение препарата способствует усилению синтеза перекрестно-реагирующих антител;
- методы получения антител против *IgG* и *IgM* человека могут быть использованы в развитии отечественной импортозамещающей технологии производства антивидовых конъюгатов для ИФА-наборов.

### Список литературы

1. Пивень Н.В. Иммунохимический анализ: научные основы, тенденции развития и возможности практического использования // Иммунопатология, аллергология, инфектология.-2007.-№2.-С.6-22
- 2.Берзина А.Г., Гамалея Н.Б., Капанадзе Г.Д. Методические подходы к получению антивидовых антисывороток с целью их использования в иммунофармакологических исследованиях // Биомедицина-2013.-№2.- С.95-102
- 3.Oliveira AC, Borges HD, Carvalho FR, de Macêdo AG Jr, Mota CM, Oliveira AM, Santiago FM, Araújo CG, Silva DA, Mineo TW, Abdallah VO, Mineo JREvaluation of colostrum as an alternative biological sample for the diagnosis of human congenital toxoplasmosis//BMC Infect Dis. – 2015. Nov 14;15(1):519. doi: 10.1186/s12879-015-1242-z.
- 4.Iddawela D, Ehambaram K, Kumarasiri PV, Wijesundera S.Development and validation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for the diagnosis of toxoplasmosis in Sri Lanka//Ceylon Med J.- 2015.- Vol.60, №3.-P.82-86.
- 5.Li L, Cai B, Tao C, Wang L. Performance Evaluation of CLIA for *Treponema Pallidum* Specific Antibodies Detection in Comparison with ELISA//J Clin Lab Anal.-2015.- Feb 25. doi: 10.1002/jcla.21839.
- 6 Olajide OM, Aminu M, Randawa AJ, Adejo DS. Seroprevalence of rubella-specific IgM and IgG antibodies among pregnant women seen in a tertiary hospital in Nigeria //Int J Womens Health.-2015.-Vol.7.-P.75-83.
- 7.Ziegelmaier R, Behrens F, Enders G. ELISA (demonstration of IgG and IgM antibodies in cytomegaly and rubella virus infections) // Ric Clin Lab. 1980.-Vol.10, Suppl 2.-P.83-92.

8. Patel EU, Manucci J, Kahle EM, Lingappa JR, Morrow RA, Piwowar-Manning E, James A, Maluzi KF, Cheeba MM, Gray G, Delany-Moretlwe S, Inambao M, Vwalika B, Quinn TC, Laeyendecker O. Precision of the Kalon Herpes Simplex Virus Type 2 IgG ELISA: an international inter-laboratory assessment // BMC Infect Dis. 2015.- Sep 30;15:398. doi: 10.1186/s12879-015-1130-6.

9. Wastling J.M. and Mattsson J.G. Detection of *Toxoplasma gondii* // J. Methods in Molecular Biology. - 2003.- Vol.216.- P.289-298.

10. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М.: Изд-во «Мир».- 1979.- С.267.

11. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н.Р. Антитела. Методы. - М.: Мир, 1991.- С.287.

12. Сайдуддин Т.С. Основы серологии.- Алма-Ата: Ғылым, 1992.- 272 с.

**Abstract.** The paper presents the results of the development of methods for immunization of rabbits to obtain antisera against human *IgG* and *IgM*. It has been established that *IgG* preparation demonstrate higher immunogenicity when its booster dose was injected intravenously as compared with subcutaneous administration. Nevertheless, antiserum obtained by using subcutaneous booster injection of *IgG* had a higher specificity and allowed to distinguish *IgG* from *IgM*, whereas the intravenous administration of the preparation contributed to increased synthesis of cross-reactive antibodies. The methods for obtaining polyclonal antibodies can be used in the development of import-substituting domestic technology for production of ELISA kits' anti species conjugates.

**Түйін.** Мақалада адам *IgG* и *IgM* қарсы анти қан сарысуларын алу мақсатында қояндарды иммундеу әдістерін әзірлеу нәтижелері келтірілген. *IgG* препаратын тері астына енгізумен салыстырғанда, қан тамырына бустерлік мөлшерін енгізгенде жоғары иммуногенділік танытатындығы анықталды. Алайда, *IgG* тері астына егу арқылы алынған қан сарысуының телімділігі жоғары болды және *IgG* мен *IgM* ажыратуға мүмкіндік берді, ал қан тамырға енгізген препарат телімсіз-байланысатын антиденелердің түзілуін үдете түсті. Әзірленген поликлоналды антиденелерді алу әдісін ИФТ-жинақтарына арналған антитүрлік конъюгаттарды өндірудің отандық, импортты алмастырушы технологиясын дамытуда қолдануға болады.

**Благодарность.** Работа выполнена в рамках НТП 0.0659 «Промышленные биотехнологии» МОН РК по проекту: «Разработка технологии производства иммуноферментной тест-системы для диагностики токсоплазмоза».