

*В.Е. БРАСЛАВСКИЙ,
К.Э. ТОЙКИНА,
О.М. КОСТРОВА,
А.А. ЛАЗАРЕНКО, И.Ф.
БАРИНСКИЙ,
В. А. АЛЕШКИН.
Институт аллергологии и
клинической иммунологии,
Московский научно-
исследовательский институт
эпидемиологии и
микробиологии
им. Г. Н. Габричевского.
Москва, Россия*

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ГЕРПЕССПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Широкая и повсеместная распространенность вируса простого герпеса (ВПГ) I и II типа в природе, разнообразие путей и способов его передачи, способность его к длительной персистенции в организме хозяина и политропность приводят к практически тотальной инфицированности им взрослого населения. У большинства людей первичная герпетическая инфекция протекает субклинически или асимптомно, принимая характер вирусоносительства. Однако серьезную проблему представляет ВПГ для лиц со сниженной или измененной иммунологической реактивностью,

больных, получающих длительную цитостатическую терапию, а также для женщин во время беременности (1, 4).

Всестороннее изучение механизмов повреждающего действия вируса на клетку, а также звеньев иммунного ответа позволило установить, что уже при первом контакте антигенов оболочки и ДНК герпесвирусов с воспринимающей частью иммунной системы хозяина запускается многоэтапный иммунный ответ. В норме он за 14-28 дней приводит к созданию в организме последовательно: неспецифических альфа-, бета- и гамма-

интерферонов; специфических противогерпетических антител, нескольких классов и разной направленности (типоспецифических и гаплотипоспецифических иммуноглобулинов), обеспечивающих нейтрализацию свободных вирусных частиц, активирование реакций комплемент-опосредованного лизиса и антителозависимую клеточную цитотоксичность; усиление активности естественных клеток-“киллеров” (NK). Возникает мощный пул высокоспециализированных клеток-“киллеров”(гаплотипоспецифических Т-киллеров). (2, 5) Однако у одной трети населения инфекция приобретает манифестный характер, что может быть связано с дефектами в разных звеньях иммунного ответа, а именно:

- дефицитом гамма- интерферона;
- дефицитом гаплотипоспецифических Т-киллеров;
- дефицитом противогерпетических антител.

Анализ лабораторных данных выявил, что рецидивы герпетической инфекции часто развиваются на фоне высокого уровня специфических антител. Причиной обострения в данном случае, возможно, является селективная недостаточность гуморального иммунного ответа, выражающегося в неспособности организма синтезировать антитела к определенным эпитопам вируса, и/или синтез низко-аффинных антител, неспособных выводить антиген из организма, что приводит к образованию и длительному присутствию в крови иммунных комплексов, повреждающих ткани организма вследствие активации системы комплемента. Поэтому у людей с дефектами противогерпетического иммунитета иммунный ответ оказывается либо количественно и качественно незавершенным, либо недостаточно специфичным. С этой точки зрения одним из перспективных подходов при профилактике и лечении заболеваний вызываемых ВПГ I и II типа является применение препаратов специфического иммуноглобулина направленного действия (10). В связи с этим чрезвычайно существенным является разработка и стандартизация эффективных методов оценки содержания вирусспецифических антител в донорских сыворотках, являющихся исходным сырьем для получения данных препаратов.

Материалы и методы

Имуноферментный анализ

Тестирование герпесспецифических антител осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в непрямой модифи-

кации. Анализ проводили с использованием имуноферментных тест-систем ЗАО “Вектор Бест”. В лунки вносили по 100 мкл исследуемой сыворотки в соответствующих разведениях и инкубировали в течении 1 часа. После многократного промывания фосфатно-солевым буфером и высушивания в лунки вносили по 100 мкл козьих аффинно очищенных антител к IgG человека конъюгированных с пероксидазой хрена и инкубировали еще в течении 40 мин. Затем раствор конъюгата удаляли, планшет промывали ФСБ и после высушивания вносили по 100 мкл р-ра о- фенилендиамина и инкубировали в течении 20-25 мин в темноте, реакцию тормозили добавлением 50 мкл 2,0 М H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли при 492 нм на спектрофотометре типа “Мультискан”. За титр принимали разведение на 0,1 ед превышающее среднее значение отрицательного контроля.

Определение

вируснейтрализующих антител

В реакции использовали монослойную культуру куриного эмбриона. В качестве антигена служили штаммы ВПГ I и II типа. Рабочая доза вируса ЛД была определена в предварительных экспериментах. Сыворотки исследовались в разведениях от 1:10 до 1:320. Реакция нейтрализации проводилась *in vitro* по классической методике. После инкубирования сывороток с антигеном в течении 1,5 часа при 37 С данная смесь вносилась на монослойную культуру. Результаты реакции учитывали через 14-72 час. За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором не наблюдалось цитопатического действия в культуре ткани. В качестве отрицательного контроля использовалась сыворотка крови кролика.

Определение аффинности

герпесспецифических антител

Определение аффинности герпесспецифических антител проводили методом ИФА с использованием различных концентраций тиоционата аммония, вызывающего диссоциацию иммунных комплексов антиген-антитело, в соответствии с методикой, разработанной Luxton и Thompson (8, 9), на тест-системах ЗАО “Вектор-Бест”.

В лунки полистироловых планшетов с сорбированным вирусным антигеном вносили по 100 мкл сывороток в разведении, дающем при длине волны 492 нм ОП 800-1200 ед. Инкубацию проводили при 37 С в течении 1 час. После тщательной промывки и высушивания в лунки вносили по 100 мкл тиоционата аммония в концентрациях(1, 2,

3, 4, 5 М), инкубировали 15 мин. при комнатной температуре, затем планшеты промывались и высушивались, после чего в лунки вносили по 200 мкл 1% БСА в 0,4% NaCl. Далее опыт проводили по методике ИФА. Относительную аффинность антител (Relative Affinity Value) определяли по формуле: $RHAV = A1 \times 12 + A2 \times 10 + A3 \times 8$, где $A1, A2, A3$ - процент антител, оставшихся в лунках после их обработки тиоцианатом аммония в концентрациях 5, 4, 3 М соответственно (3).

Результаты

Традиционным видом сырья, предназначенным для производства препаратов иммуноглобулинов человека, является донорская кровь. Нами было определено содержание противогерпетических IgG, уровень вируснейтрализующих антител и RHAV специфических IgG в сыворотках крови

400 индивидуальных доноров. Результаты приведены в таблице N1.

Как видно из представленных данных, содержание противогерпетических IgG в исследуемых сыворотках распределялось следующим образом: 63% сывороток имели титр от 1:200 до 1:1800, 23% - 1:5400, 13% - более 1:16200 и 1% сывороток практически не содержал герпесспецифических антител.

Определение уровня специфических антител к ВПГ в реакции биологической нейтрализации показало, что 81% сывороток имел титр вируснейтрализующих антител менее 1:40, 19% сывороток - титр более 1:40.

Исследование аффинности герпесспецифических антител выявило, что 45% сывороток имело $RHAV = 258-395$; 32% - $RHAV = 401-487$; 23% - $RHAV > 500$.

Таблица 1

Методы определения герпесспецифических антител в сыворотке крови

| Метод | Выделенные группы | Число сывороток | % от общего кол-ва |
|-----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| ИФА | 600 - 1800 | 252 | 63 |
| | 5400 | 92 | 23 |
| | 16200-48600 | 52 | 13 |
| | отрицательная | 4 | 1 |
| Реакция нейтрализации | 10 -20 | 172 | 43 |
| | 20 - 40 | 152 | 38 |
| | выше 40 | 76 | 19 |
| RHAV | 258-395 | 180 | 45 |
| | 401-487 | 128 | 32 |
| | >500 | 92 | 23 |

Проанализировав полученные данные, мы отобрали 20 сывороток, имеющих высокий уровень как герпесспецифических, так и вируснейтрали-

зующих антител. При этом RHAV этих сывороток имел значение более 500. Данные по 5 отобранным сывороткам представлены в таблице N2.

Таблица 2

Образцы сыворотки крови пациентов с высоким титром и активностью герпесспецифических антител

| Отобранные образцы | Титр IgG к ВПГ I и II типаI | Титр вируснейтрализующих антител | RHAV |
|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|------|
| N25 | 48600 | 40 | 589 |
| N38 | 16200 | 80 | 621 |
| N53 | 16200 | 40 | 517 |
| N89 | 48600 | 80 | 612 |
| N123 | 16200 | 40 | 520 |

Обсуждение

Одним из ключевых моментов при создании препаратов иммуноглобулинов направленного действия является разработка метода анализа содержания данных иммуноглобулинов в исходном сырье и в конечных препаратах.

Очевидно, что для получения высокоэффективного препарата необходимо определение количественного содержания специфических антител иммунохимическими методами, в частности ИФА. Данный метод, основанный на способности антител специфически взаимодействовать с вирусными антигенами, иммобилизованными на твердофазном носителе, характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, а также несложной постановкой. Вместе с тем надо подчеркнуть, что ИФА дает только количественную характеристику гуморального ответа организма на вирусную инфекцию, не дифференцируя антитела по их функциональной значимости, в то время как герпетическая инфекция характеризуется наличием широкого спектра специфических антител, обладающих различной противовирусной активностью. Они участвуют как в нейтрализации

свободных вирусных частиц так и в активировании ими реакций комплемент- опосредованного лизиса и АЗКЦ (7, 11) В то же время известно, что многие хронические процессы протекают на фоне выраженной поликлональной активации В-системы иммунитета и, как правило, при этом происходит синтез низко- аффинных антител, обладающих пониженной способностью к элиминации из организма антигенов (6). Очевидно, что иммунодефицит при ВПГ I и II типа может быть вызван как количественным недостатком антител, так и их недостаточной функциональной активностью. Поскольку в настоящее время наиболее доступными методами, позволяющими оценить активность антител, является реакция определения вируснейтрализующих антител и разработанный Luxton и Thompson метод определения аффинности антител, представляется целесообразным анализировать содержание антител к ВПГ в биологическом материале тремя методами: количественным определением содержания противогерпетических антител, методом ИФА реакцией нейтрализации и определением аффинности вирусспецифических антител.

Литература

1. Баринский И. Ф., Шубладзе А.К., Каспаров А.А., Гребенюк В.Н. Герпес. – М.: Медицина.1986..
2. Материалы ХУІ международной конф. По изучению герпесвирусов. 7-12 июля 1991 г. Сан-Франциско, США.
3. Кулаков А.В., Пинегин Б.В., Карсонова В.Д., Папуашвили М.Н., Прокопенко В.Д., Сиимонова А.В., Хаитов Р.М. Некоторые особенности гуморального антибактериального иммунитета у ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом // Журн. Микробиол., 1998, N 3, С. 35-39.
4. Whitley R.J. Herpes simplex virus infections of women and their offspring: implications for a developed society // Proc Natl Acad USA 1994, 91, 2441-7.
5. Hashido M.,Takashi K. HSV – specific IgM, IgA and IgG subclass antibody responses in primary and nonprimary genital Herpes patients //J. Microbiol. Immunol. D19, 1996, p. 415-420.
6. Hashido M. Inouye S. and Kawana T. Differentiation of primary from nonprimary genital Herpes infections by a HSV- specific IgG avidity assay // J. Clin. Microbiol, 1997, 35-7, p. 1766-1768.
7. Zane A. Brown, Stacy Selke et. al. The acquisition of HSV during pregnancy // N Engl J Med 1997, 337, p.509-515.
8. G. R. Pullen, Margaret G. Fitzgerald and C.S. Hoskin. Antibody avidity determination by ELASA using thiocyanate elution // J. Immunological Methods, 1986, 86, p. 83-87.
9. Luxton R. W., Thompson E.I. Affinity distributions of antigen- specific IgG in patients with multiple sclerosis and in patients with viral encephalitis // J. Immunological Methods, 1990, 131, p. 277-282.
10. Litwinska B., Bucholo B., Sadowski W., Kantoch M. Antiviral activity of commercial immunoglobulin preparations // J. Med. Dosw. Microbiol.,1990, 72-2, p. 207-210.
11. Corey L. The current trend in genital herpes: progress in prevention.// J. Sex Transm Dis 1994, 21, 38-44.