

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Бызова Н.А.¹, Жердев А.В.¹, Горбатов А.А.², Бикетов С.Ф.², Дзантиев Б.Б.¹

РАЗРАБОТКА И СОПОСТАВЛЕНИЕ ТРЕХ ВИДОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ СЕРОДИАГНОСТИКИ ТУЛЯРЕМИИ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПО СОСТАВУ ДЕТЕКТИРУЕМЫХ МЕЧЕНЫХ ИММУННЫХ КОМПЛЕКСОВ

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, г. Москва, Россия;

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, 142279, пос. Оболенск Московской области, Россия

Иммунохроматография (ИХ) активно используется в современной практике серодиагностики – выявления в крови антител, специфичных к определённому патогену. Возможно несколько вариантов формирования в ходе ИХ меченых иммунных комплексов, выбор между которыми требует экспериментальных оценок применительно к разным инфекциям. В статье представлены разработка и сравнение трёх схем ИХ для выявления антител против возбудителя туляремии, отличающихся по составу детектируемых комплексов: антиген – специфические антитела – меченый антиген (схема I); антиген – специфические антитела – меченые антивидовые антитела (схема II) и антивидовые антитела – специфические антитела – меченый антиген (схема III). Для сравнения тест-систем использованы сыворотки крови больных туляремией, боррелиозом и здоровых доноров (n=31). Для всех схем в выбранных условиях отсутствовали ложноположительные результаты, степени выявления больных характеризовались рядом: схема II > схема III > схема I. Продолжительность ИХ для всех схем – 10 мин.

Ключевые слова: серодиагностика; иммунохроматография; тест-полоски; меченые иммунные комплексы; туляремия; *Francisella tularensis*

Для цитирования: Бызова Н.А., Жердев А.В., Горбатов А.А., Бикетов С.Ф., Дзантиев Б.Б.

Разработка и сопоставление трех видов иммунохроматографических тест-систем для серодиагностики туляремии, отличающихся по составу детектируемых меченых иммунных комплексов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (11): 592-600.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-592-600>

Для корреспонденции: Дзантиев Борис Борисович, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. иммунобиохимии; e-mail: dzantiev@inbi.gas.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКР 1.1.17 по государственному заданию ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии.

Поступила 11.09.2024

Принята к печати 23.09.2024

Опубликовано 25.10.2024

Byzova N.A.¹, Zherdev A.V.¹, Gorbatov A.A.², Biketov S.F.², Dzantiev B.B.¹

DEVELOPMENT AND COMPARISON OF THREE TYPES OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR SERODIAGNOSIS OF TULAREMIA, DIFFERING IN THE COMPOSITION OF DETECTED LABELED IMMUNE COMPLEXES

¹A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russia;

²State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russia

Immunochromatography (IC) is widely used in modern practice of serodiagnostics, detection of antibodies specific to a certain pathogen in the blood. Several variants of labeled immune complexes formation during IC are possible; the choice between them requires experimental assessments in relation to different infections. The article presents the development and comparison of three IC schemes for revealing antibodies against the causative agent of tularemia, differing in the composition of the detected complexes: antigen – specific antibodies – labeled antigen (scheme I); antigen – specific antibodies – labeled anti-species antibodies (scheme II) and anti-species antibodies – specific antibodies – labeled antigen (scheme III). Blood sera of patients with tularemia, borreliosis and healthy donors (n=31) were applied to compare the test systems. For all schemes, there were no false positive results under the selected conditions, and the revealing of sick patients was characterized by the following row: scheme II > scheme III > scheme I. The testing time for all schemes was 10 min.

Key words: serodiagnostics; immunochromatography; test strips; labeled immune complexes; tularemia; *Francisella tularensis*

For citation: Byzova N.A., Zherdev A.V., Gorbatov A.A., Biketov S.F., Dzantiev B.B. Development and comparison of three types of immunochromatographic test systems for serodiagnosis of tularemia, differing in the composition of detected labeled immune com-

plexes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (11): 592-600 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-11-592-600>

For correspondence: *Dzantiev Boris Borisovich*, Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Immunobiochemistry; e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Information about authors:

Byzova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-0025-8370>;

Zherdev A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3008-2839>;

Gorbatov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0799-893X>;

Biketov S.F., <https://orcid.org/0000-0003-1179-6895>;

Dzantiev B.B., <https://orcid.org/0000-0003-4008-4918>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgments. *The work was carried out within the framework of the research and development project 1.1.17 under the state assignment of the State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology.*

Received 11.09.2024

Accepted 23.09.2024

Published 25.10.2024

Введение. Туляремия - зоонозная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*. Частая встречаемость возбудителя туляремии в объектах окружающей среды сочетается с разнообразием путей инфицирования [1]. Опасность инфекции для людей обусловлена высокой восприимчивостью к возбудителю, значительной смертностью при отсутствии терапии и рисками серьезных осложнений [2].

Для клинической лабораторной диагностики туляремии применяют две группы методов, направленных на выявление либо возбудителя инфекции (культуральный [3], молекулярно-генетический [4,5], иммунологический [6] методы), либо специфических антител к возбудителю (серологический метод, прежде всего – иммуноферментный анализ [7-10]). Эти методы, как правило, весьма продолжительны (несколько часов) и требуют использования специализированного оборудования, что ограничивает возможности оперативного принятия решений, и проведения массовых скрининговых тестирований.

Одним из самых быстрых и методически простых иммунологических методов является иммунохроматография (ИХ), продолжительность которой составляет 10-15 минут [11,12]. ИХ позволяет выявлять как возбудителя инфекции, так и антитела к нему. Хотя выработка антител в организме требует времени, их мониторинг в крови имеет определённые преимущества из-за простого отбора проб для тестирования с хорошей воспроизводимостью получаемых результатов [13]. Результаты ИХ серодиагностики просто интерпретировать: присутствие в пробе антител к возбудителю инфекции определяется по окрашиванию определённого участка (аналитической зоны) тест-полоски вследствие формирования специфических иммунных комплексов, меченных окрашенными частицами, чаще всего – наночастицами золота (НЧЗ) [14].

Для серодиагностики могут быть использованы схемы ИХ, отличающиеся компонентами образующихся в аналитической зоне комплексов и ходом их формирования при проведении ИХ. Эти возможности описаны в ряде публикаций [15-17], однако вопрос о наиболее диагностически эффективной схеме ИХ серодиагностики продолжает оставаться открытым. Немногие проводившиеся сравнительные исследования свидетельствуют

о том, что выбор зависит от особенностей иммунного ответа на тот или иной патоген, от способа получения меченых иммунореагентов [17,18].

Цель исследования - разработка и сравнение трёх схем иммунохроматографической серодиагностики туляремии (рис. 1): схема I – иммобилизация антигена *F. tularensis* в аналитической зоне тест-полоски и на поверхности НЧЗ; схема II – иммобилизация антигена в аналитической зоне и антивидовых антител на поверхности НЧЗ; схема III – иммобилизация антивидовых антител в аналитической зоне и антигена на поверхности НЧЗ.

Материал и методы. В работе использованы моноклональные антитела клона Fb11 к липополисахариду (ЛПС) штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ. Согласно [19] ЛПС выделяли из клеток *F. tularensis* фенольной экстракцией и лиофилизовали.

Для синтезов готовили деионизованную воду с удельным сопротивлением при 25° С не менее 18,2 МОм·см с помощью системы Simplicity Milli-Q (фирма «Millipore», США). Наночастицы золота синтезировали методом G. Frens [20] с использованием золотохлористоводородной кислоты и цитрата натрия (оба реагента фирмы «Sigma-Aldrich», США). ЛПС и иммуноглобулины класса IgG (IgG) козы к IgG человека (IgG_{к/ч}, фирма «Arista Biologicals», США) конъюгировали с НЧЗ адсорбционной иммобилизацией. Для получения конъюгатов ЛПС-НЧЗ наночастицы с оптической плотностью (ОП) при 522,5 нм, равной 1,0, доводили до pH 7,0 добавлением 0,1 М K₂CO₃. ЛПС (pH 7,0) разбавляли до 1 мг/мл и вносили 300, 100, 30, 10, 3 или 1 мкл ЛПС в 10 мл НЧЗ. Смеси инкубировали 30 минут при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили 0,25 мл 10% бычьего сывороточного альбумина (БСА, фирма «Sigma-Aldrich», США). Конъюгаты ЛПС-НЧЗ с разной нагрузкой по ЛПС обозначали ЛПС(30-0.1)-НЧЗ. При конъюгировании IgG_{к/ч} к НЧЗ добавляли 61,2 мкл IgG_{к/ч} (1 мг/мл), а остальные стадии проводили также, как для ЛПС. В качестве контроля в тех же условиях получали конъюгат НЧЗ с БСА. Для всех синтезов, несвязавшиеся с НЧЗ молекулы отделяли 15-минут центрифугированием при 20 тыс. g и 4 °С (центрифуга Allegra 64R, «Beckman Coulter», США). После удаления надосадочных жидкостей осадки перерастворили в 20 мМ

трис-НСI буфере, рН 7,6, содержащем 1,0% БСА, 1,0% сахарозы, 0,1% детергента Твин-20 и 0,1% NaN_3 (все препараты – фирмы «Sigma-Aldrich», США), и хранили при 4-6 °С.

При спектрофотометрической характеристике НЧЗ и их конъюгатов с ЛПС и $\text{IgG}_{\text{K}^{\text{ч}}}$ использован спектрофотометр Biochrom Libra S80 (фирма «Biochrom», Великобритания). Просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) проводили согласно [21] с помощью микроскопа CX-100 (фирма «Jeol», Япония), микрофотографии анализировали в цифровой форме, используя программу Image Tool (University of Texas Health Science Center at San Antonio, США). Для регистрации динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) применяли прибор Zetasizer Nano (фирма «Malvern», Великобритания), проводя измерения (три 30-сек. цикла в трёх повторностях) с углом рассеяния 173° и обрабатывая данные с помощью программы Malvern Softwarever (фирма «Malvern», Великобритания).

Функциональная активность конъюгатов характеризовалась методом иммуноферментного анализа (ИФА) в прозрачных микропланшетах фирмы «Corning Costar» (США) с использованием фотометра Zenyth 3100 («Anthos Labtec Instruments», Австрия). Для конъюгатов ЛПС-НЧЗ проверяли способность ЛПС в их составе конкурировать с ЛПС, иммобилизованным в лунках микропланшета, за связывание с антителами Fb11. Для этого в лунки вносили по 100 мкл ЛПС (1 мкг/мл) в 50 мМ фосфатном буфере, рН 7,6, содержащем 100 мМ NaCl (ФБС), и инкубировали при 4° С в течение ночи. Микропланшет четырёхкратно промывали ФБС, содержащим 0,05% детергента Тритон X-100 фирмы «Sigma-Aldrich», США (ФБСТ). Затем в лунки вносили по 50 мкл растворов конъюгатов ЛПС-НЧЗ (от 0,001 до 2,0 опт. ед.) и антител Fb11 (1 мкг/мл) в ФБСТ и инкубировали 1 час при 37 °С. Четырёхкратно про-

мывали микропланшет ФБСТ, вносили в лунки по 100 мкл пероксидазного конъюгата антител быка против IgG мыши (разведение 1:3000 в ФБСТ; фирма «Имтек», Россия) и инкубировали 1 час при 37 °С. После четырёхкратной промывки определяли активность связанной пероксидазы. Для этого в лунки вносили по 100 мкл 40 мМ натрий-цитратного буфера, рН 4,0, с 0,4 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин дигидрохлоридом (ТМБ, «Sigma-Aldrich», США) и 3 мМ H_2O_2 , инкубировали 15 минут при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 и измеряли ОП при 450 нм.

Для конъюгата $\text{IgG}_{\text{K}^{\text{ч}}}$ -НЧЗ проверяли способность антител $\text{IgG}_{\text{K}^{\text{ч}}}$ в его составе связываться с IgG человека («Имтек», Россия). Для этого IgG человека (1 мкг/мл) иммобилизовали в лунках в тех же условиях, что и ЛПС. Далее с такими же продолжительностями стадий, буферами и отмытками последовательно инкубировали в лунках конъюгат $\text{IgG}_{\text{K}^{\text{ч}}}$ -НЧЗ (от 0,001 до 2,0 опт. ед.) и пероксидазный конъюгат антител быка против IgG козы (разведение 1:3000 в ФБСТ; «Имтек», Россия). Активность связанной пероксидазы определяли, как описано выше.

Сыворотки с антителами к *F. tularensis* и без них получали взятием крови у пациентов и доноров на основании их письменного добровольного информированного согласия на исследование. Для выявления в сыворотках антител к *F. tularensis* методом ИФА в лунках микропланшета иммобилизовали ЛПС (1 мкг/мл) и последовательно добавляли сыворотку (разведения от 1:25 до 1:50000) и пероксидазный конъюгат антител быка против IgG человека (разведение 1:3000 в ФБСТ; «Имтек», Россия) при тех же условиях инкубаций, отмыток и регистрации активности пероксидазы, что и описанных выше методиках ИФА.

ИХ тест-полоски изготавливали из нитроцеллюлоз-

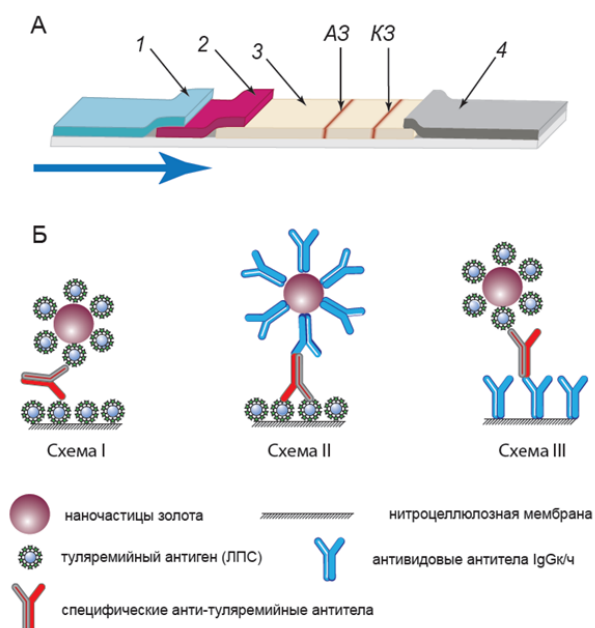


Рис. 1. Три схемы ИХ серодиагностики. А - строение ИХ тест-полоски (1 – мембрана для впитывания пробы; 2 – стекловолоконная мембрана с маркерным конъюгатом; 3 – нитроцеллюлозная мембрана; 4 – конечная абсорбирующая мембрана; АЗ – аналитическая зона; КЗ – контрольная зона) и иммуноаналитические реагенты. Стрелкой показано направление движения пробы и реагентов во время ИХ. Б - комплексы, образующиеся в аналитических зонах при проведении ИХ по схемам I-III.

ной мембраны CNPC-15, стекловолоконной мембраны РТ-Р7, мембраны для впитывания пробы GFB-R4 и конечной абсорбирующей мембраны AP045 фирмы «Advanced Microdevices» (Индия) (рис. 1, А). Аналитическую и контрольную зоны (АЗ и КЗ) нитроцеллюлозной мембраны формировали нанесением реагентов с помощью дозатора IsoFlow («Image Technology», США) из ФБС с расходом 0,12 мкл/мм: для схемы I – ЛПС (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела Fb11 (0,5 мг/мл) в КЗ, для схемы II – ЛПС (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела кролика против IgG козы (0,5 мг/мл; фирма «Имтек», Россия) в КЗ, для схемы III – IgG_{кч} (1,0 мг/мл) в АЗ, антитела Fb11 (0,5 мг/мл) в КЗ. На стекловолоконную мембрану с расходом 0,8 мкл/мм наносили конъюгаты с ОП 4,0: ЛПС(3)-НЧЗ для схем I и III и IgG_{кч}-НЧЗ для схемы II. Мембраны высушивали при комнатной температуре в течение 12 часов и все четыре компонента наклеивали на пластиковую подложку. Полученные композиты разрезали на тест-полоски шириной 3,5 мм, используя гильотинный резак Index Cutter-1 («A-Point Technologies», США), и хранили при комнатной температуре в zip-пакетах с силикагелем.

ИХ детекция антител к *F. tularensis* проводили по следующей методике. Конец тест-полоски окунали в 50 мкл пробы (сыворотки, разведенные в 10, 30 или 100 раз в ФБСТ) в лунке микропланшета. Через 10 минут тест-полоску извлекали, сканировали с помощью сканера CanoScan 9000F («Canon», Япония) и использовали программу TotalLab TL120 («Nonlinear Dynamics», Великобритания) для определения интенсивности

сформированных окрашенных зон.

Результаты. Синтез и характеристика НЧЗ.

Для получения НЧЗ использовали вариант методики Френса [20], соответствующий ожидаемому среднему диаметру наночастиц 20-30 нм. Спектр поглощения продукта синтеза (рис. 2А) имел широкий пик с максимумом при 522,5 нм. Наличие этого пика обусловлено эффектом поверхностного плазмонного резонанса между частотами световой волны и коллективных колебаний свободных электронов на поверхности НЧЗ [22]. Согласно [23], средний диаметр НЧЗ (y) определяется на основании длины волны этого пика (x) по формуле $y = -1330 + 2,6 \cdot x$. Соответствующий расчёт даёт величину 28,5 нм. Результаты этого простого и нетрудоёмкого измерения сопоставлены с данными ПЭМ и ДЛС. Как видно из представленного фрагмента микрофотографии (рис. 2, Б), препарат НЧЗ не содержал агрегаты, форма частиц близка к сферической. По данным измерений, проведенных для 95 изображений НЧЗ на микрофотографии (рис. 2, В), средний диаметр НЧЗ составил $(28,1 \pm 2,3)$ нм, что хорошо соответствует результатам спектрофотометрии. Коэффициент эллиптичности, вычисляемый как отношение большой и малой осей частицы, равнялся $1,08 \pm 0,04$, что свидетельствует о близости формы НЧЗ к сферической. Измерения ДЛС также дали близкие значения среднего гидродинамического диаметра, 31,4 нм, при относительно низком индексе полидисперсности ($Pdi = 0,183$), отражающем высокую гомогенность препарата НЧЗ по размерам.

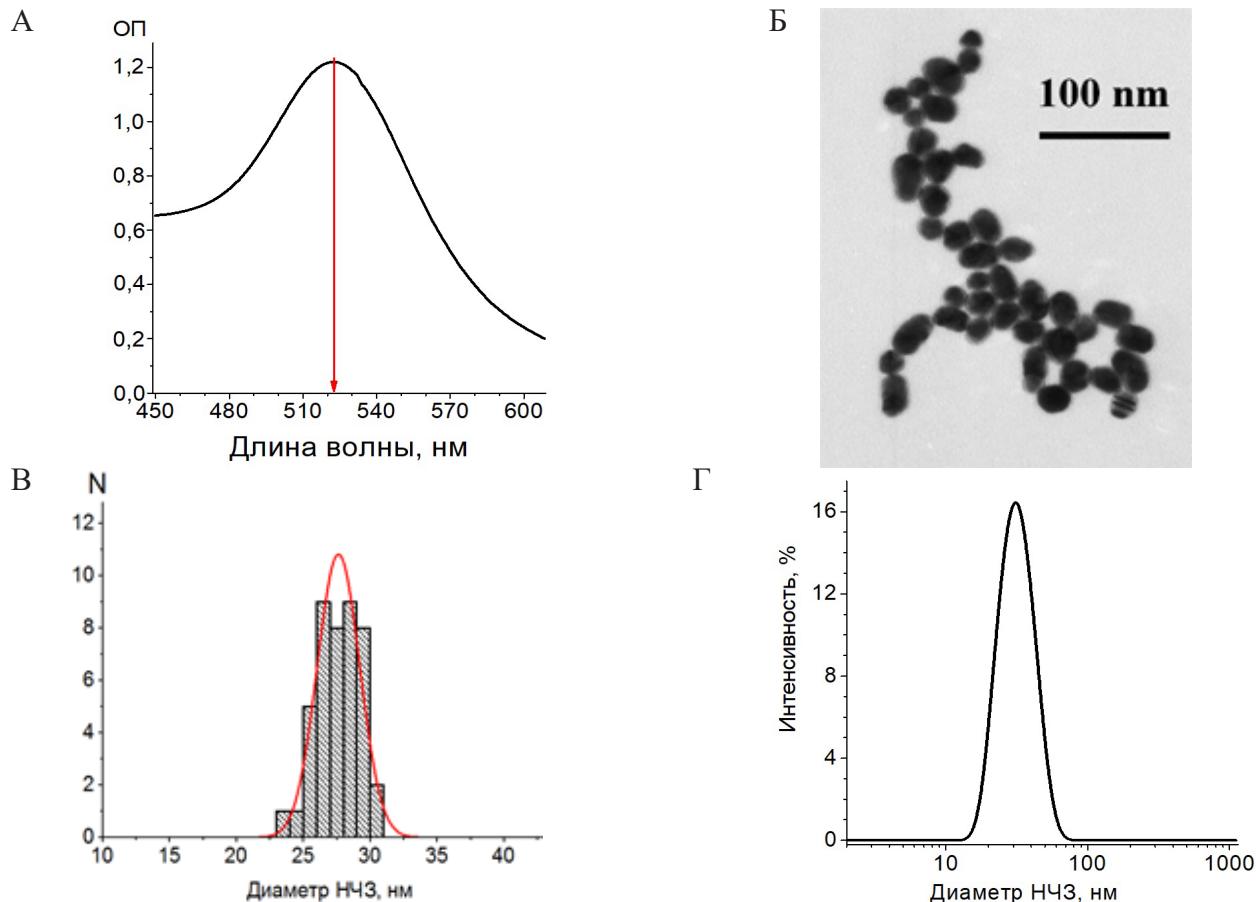


Рис. 2. Характеристика препарата НЧЗ. А - спектр поглощения (стрелкой показано положение пика); Б - фрагмент электронной микрофотографии; В - гистограмма распределения диаметров НЧЗ по данным ПЭМ (выборка из 95 частиц); Г - распределение гидродинамических диаметров.

Синтез и характеристика конъюгатов НЧЗ с антигеном и антителами. Конъюгаты IgG_{κ/ч}-НЧЗ и ЛПС-НЧЗ получены посредством адсорбционной иммобилизации. Для IgG_{κ/ч} согласно рекомендациям [24], вычислена концентрация, обеспечивающая монослойное покрытие поверхности НЧЗ. Для установленного среднего диаметра частиц 28,5 нм она равнялась 6,12 мкг/мл. Для ЛПС, в связи с отсутствием данных о его конъюгировании с НЧЗ, получена серия препаратов, варьируя концентрации ЛПС от 0,1 до 30 мкг/мл.

Для проверки успешности конъюгирования пре-

параты охарактеризованы методами спектрофотометрии и ДЛС и полученные результаты сопоставлены с данными для нативных НЧЗ. Как следует из табл. 1, максимумы спектров поглощения продуктов синтезов сдвигаются в длинноволновую область на 3,0-3,5 нм, что соответствует возрастанию средних диаметров по сравнению с нативными НЧЗ на 4,5-5,5 нм. Близкие сдвиги диаметров наблюдались и при измерениях ДЛС. Величины Pdi при конъюгировании достоверно не изменялись, что свидетельствует о стабильности полученных препаратов.

Таблица 1

Характеристика нативных и конъюгированных НЧЗ методами спектрофотометрии и ДЛС

Препарат	Пик поглощения, нм	Диаметр (спектрофотометрия), нм	Диаметр (ДЛС), нм	Pdi (ДЛС)
НЧЗ	522,5	28,5	31,4	0,183
IgG _{κ/ч} -НЧЗ	525,5	33,0	34,8	0,189
ЛПС(3)-НЧЗ	526,0	34,0	35,9	0,192

Для конъюгата IgG_{κ/ч}-НЧЗ подтверждена способность антител в его составе связываться с IgG человека, иммобилизованными в лунках микропланшета. На рис. 3, А показано наличие этого связывания и его специфический характер.

Для конъюгатов ЛПС-НЧЗ функциональную активность характеризовали методом ИФА в конкурентном формате, когда препараты ЛПС, конъюгированного с НЧЗ и иммобилизованного в лунках

микропланшета, конкурировали за связывание со специфическими антителами. На рис. 3, Б отражена реакционная способность всех полученных конъюгатов, причём содержание в них реакционно-способных молекул ЛПС возрастало с увеличением концентрации ЛПС при конъюгировании. Для изготовления тест-полосок по схемам I и III выбран конъюгат ЛПС(3)-НЧЗ, соответствующий концентрации ЛПС при синтезе, равный 3 мкг/мл.

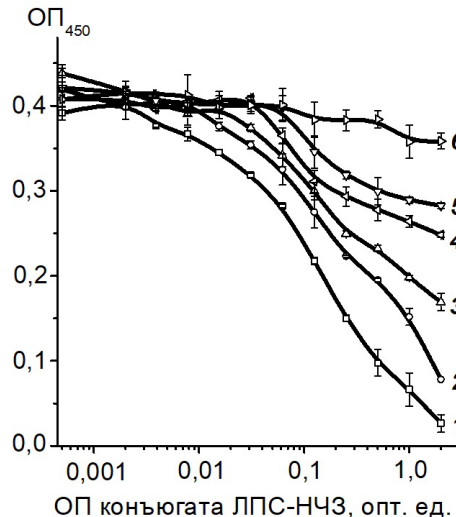
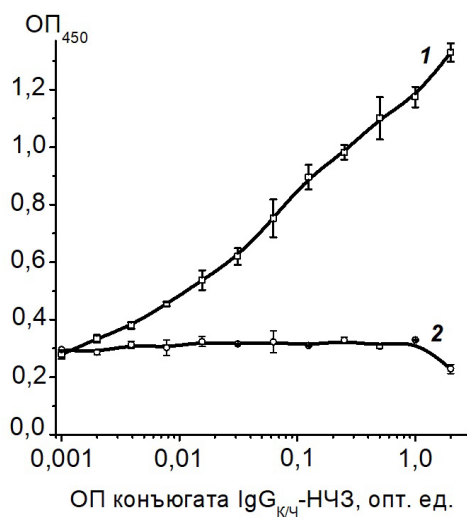


Рис. 3. Характеристика в ИФА функциональной активности конъюгатов НЧЗ с IgG_{κ/ч} (А) и ЛПС (Б). А - кривые сэндвич-ИФА 1,2 соответствуют конъюгату IgG_{κ/ч}-НЧЗ и контрольному препарату БСА-НЧЗ; Б - кривые конкурентного ИФА 1-6 соответствуют препаратам ЛПС-НЧЗ, полученным при концентрациях ЛПС 30, 10, 3, 1, 0,3 и 0,1 мкг/мл.

Реализация трёх схем иммунохроматографической серодиагностики туляремии. Тест-системы, изготовленные в соответствии с тремя рассматриваемыми схемами серодиагностики и выбранными оптимальными условиями, представленными в разделе «Материал и методы», применены для тестирования сывороток пациентов с положительными и отрицательными диагнозами по туляремии. Рассмотрена 31 сыворотка, из них 16 взяты у пациентов, больных туляремией (1т-16т), 5 - у пациентов, больных боррелиозом (1б-5б) и 10 - у доноров без

симптомов заболеваний (1зд-10зд). Помимо использования данных о клинической картине, проведена проверка сывороток методом ИФА с иммобилизованным антигеном (ЛПС) *F. tularensis*. В качестве порога статистически достоверного отличия положительных и отрицательных проб установлена величина ОП₄₅₀ в ИФА при разведении сывороток 1:300, равная 0,2 опт.ед. Результаты ИФА для всех сывороток (табл. 2) соответствовали клиническим диагнозам применительно к туляремии.

Результаты серодиагностики для трёх схем ИХ,

Таблица 2

Серодиагностика туляремии методами ИФА и тремя вариантами ИХ

№ сыворотки	ИФА	ИХ								
		Схема I			Схема II			Схема III		
	Разведения									
	1:300	1:10	1:30	1:100	1:10	1:30	1:100	1:10	1:30	1:100
ОП ₄₅₀	Интенсивности окрашивания АЗ									
Клинический диагноз – туляремия										
1Т	0,633 ± 0,014	13,2 ± 1,7	5,5 ± 1,75	3,6 ± 0,15	26,65 ± 2,65	24,05 ± 1,35	23,65 ± 1,15	3,35 ± 0,45	4,1 ± 0,2	3,65 ± 0,05
2Т	0,995 ± 0,045	16,9 ± 2,45	10,1 ± 1,3	5,7 ± 0,85	67,05 ± 1,65	61,45 ± 1,95	67,3 ± 2,5	3,45 ± 0,15	9,9 ± 0,8	8,25 ± 0,15
3Т	0,981 ± 0,002	14,1 ± 1,8	8,1 ± 0,45	2,7 ± 0,4	41,95 ± 0,95	42,7 ± 0,5	42,05 ± 1,65	2,73 ± 0,03	5,25 ± 0,25	4,7 ± 0,2
4Т	0,750 ± 0,026	15,3 ± 0,55	6,2 ± 0,35	2,1 ± 0,25	60,4 ± 0,6	60,55 ± 0,35	57,25 ± 1,25	5,7 ± 0,3	6,6 ± 0,2	6,2 ± 0,4
5Т	0,804 ± 0,03	25,9 ± 0,5	8,15 ± 0,35	0	33,7 ± 2,7	37,8 ± 3,3	30,75 ± 0,75	5,75 ± 0,05	6,05 ± 0,15	6,3 ± 0,3
6Т	0,382 ± 0,025	8,6 ± 0,3	5,8 ± 0,25	0	77,6 ± 2,4	51,05 ± 4,15	25,3 ± 0,4	17,4 ± 4,9	15,8 ± 2,0	15,35 ± 0,75
7Т	0,344 ± 0,010	37,1 ± 1,75	5,1 ± 0,35	0	67,95 ± 3,25	56,85 ± 0,95	21,85 ± 0,95	30,85 ± 1,15	23,7 ± 0,5	28,75 ± 1,35
8Т	0,818 ± 0,061	58,3 ± 0,65	21,5 ± 0,45	5,3 ± 1,5	82,1 ± 1,9	79,0 ± 1,0	76,8 ± 4,8	6,0 ± 0,5	14,65 ± 0,35	9,45 ± 0,05
9Т	0,798 ± 0,072	27,5 ± 0,15	12,5 ± 0,25	6,35 ± 0,25	54,65 ± 0,35	54,0 ± 1,5	48,2 ± 0,2	2,05 ± 0,15	4,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1
10Т	0,560 ± 0,013	21,2 ± 0,2	9,6 ± 0,35	2,5 ± 0,5	65,55 ± 1,15	61,45 ± 1,65	73,15 ± 0,25	5,8 ± 0,4	5,85 ± 0,45	5,75 ± 0,05
11Т	0,693 ± 0,019	23,45 ± 0,55	7,5 ± 0,45	2,3 ± 0,25	35,0 ± 1,5	46,95 ± 1,05	49,2 ± 0,3	2,25 ± 0,05	4,25 ± 0,55	3,8 ± 0,5
12Т	0,312 ± 0,025	2,4 ± 0,45	0	0	28,95 ± 1,35	8,05 ± 1,65	3,15 ± 1,05	4,5 ± 0,8	8,25 ± 1,15	11,85 ± 1,25
13Т	0,240 ± 0,016	8,5 ± 0,25	1,85 ± 0,15	0	35,6 ± 0,45	22,5 ± 1,2	13,25 ± 1,05	6,6 ± 1,4	4,25 ± 0,4	2,7 ± 0,45
14Т	0,200 ± 0,017	3,8 ± 0,4	0	0	32,3 ± 2,6	11,7 ± 3,1	6,6 ± 0,75	11,35 ± 0,85	8,1 ± 0,55	2,2 ± 0,25
15Т	0,250 ± 0,007	3,1 ± 0,35	0	0	30,0 ± 1,35	12,9 ± 0,8	5,3 ± 0,5	2,5 ± 0,25	1,65 ± 0,15	0
16Т	0,234 ± 0,019	4,2 ± 0,35	1,3 ± 0,05	0	38,0 ± 3,2	26,7 ± 0,7	9,2 ± 1,3	29,6 ± 0,7	14,6 ± 1,75	7,4 ± 0,6
Клинический диагноз – боррелиоз										
1б	0,165 ± 0,026	0	0	0	0	0	0	0	0	3,2 ± 0,3
2б	0,040 ± 0,006	0	0	0	0	0	0	2,0 ± 0,15	0	0
3б	0,108 ± 0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4б	0,131 ± 0,002	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5б	0,122 ± 0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Клинический диагноз – здоровые доноры										
1зд	0,14 ± 0,008	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2зд	0,135 ± 0,025	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3зд	0,048 ± 0,016	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4зд	0,128 ± 0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5зд	0,145 ± 0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6зд	0,084 ± 0,004	6,4 ± 0,55	0	0	0	0	0	0	0	0
7зд	0,104 ± 0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8зд	0,115 ± 0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9зд	0,134 ± 0,035	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10зд	0,157 ± 0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Все измерения проводились в двух повторностях.

каждая из которых реализована при трёх разведениях сывороток: 1:10, 1:30, 1:100 (см. рис. 4 с примерами тестирования проб из разных групп). представлены в табл. 2. Величины интенсивности окрашивания АЗ, начиная с 2 отн. ед., в соответствии с непосредственной визуальной оценкой и данными предыдущих применений данного протокола цифровой обработки изображений [17,18], интерпретировались как положительные результаты ИХ - наличие визуально выявляемой окрашенной полосы, величины интенсивности окрашивания АЗ, меньшие 2 отн. ед., - как отрицательные результаты ИХ - отсутствие визуально выявляемой окрашенной полосы.

При выборе разведений сывороток исключены варианты, дававшие ложноположительные результаты, что сопровождалось более высоким неспецифическим фоновым окрашиванием всей поверхности нитроцеллюлозных мембран. С учётом этого требования, а также минимизации неспецифического окрашивания, выбранные рабочие разведения для всех схем серодиагностики

составили 1:30. В этих условиях в схеме I наблюдалось 11 положительных результатов, в схеме II – 16 положительных результатов, в схеме III - 15. Все результаты - истинно положительные (подтверждённые данными ИФА и клинической картиной). Все отрицательные сыворотки при тестировании в разведении 1:30 дали отрицательные результаты для всех трёх схем ИХ. Величины диагностических чувствительностей и специфичностей серодиагностической ИХ туляремии, вычисленные на основании этих данных, суммированы в табл. 3.

Обсуждение. Наиболее известный подход в ИХ серодиагностике заключается в нанесении в АЗ антигена соответствующего патогена и иммобилизации на поверхности НЧЗ иммуноглобулинсвязывающих реагентов - антивидовых антител, белков бактерий A, G, L и др. [17,25]. Образующиеся на мембране комплексы представлены в схеме II на рис. 1. Однако при этом с конъюгатом НЧЗ взаимодействуют все иммуноглобулины пробы, из которых лишь несколько процентов или

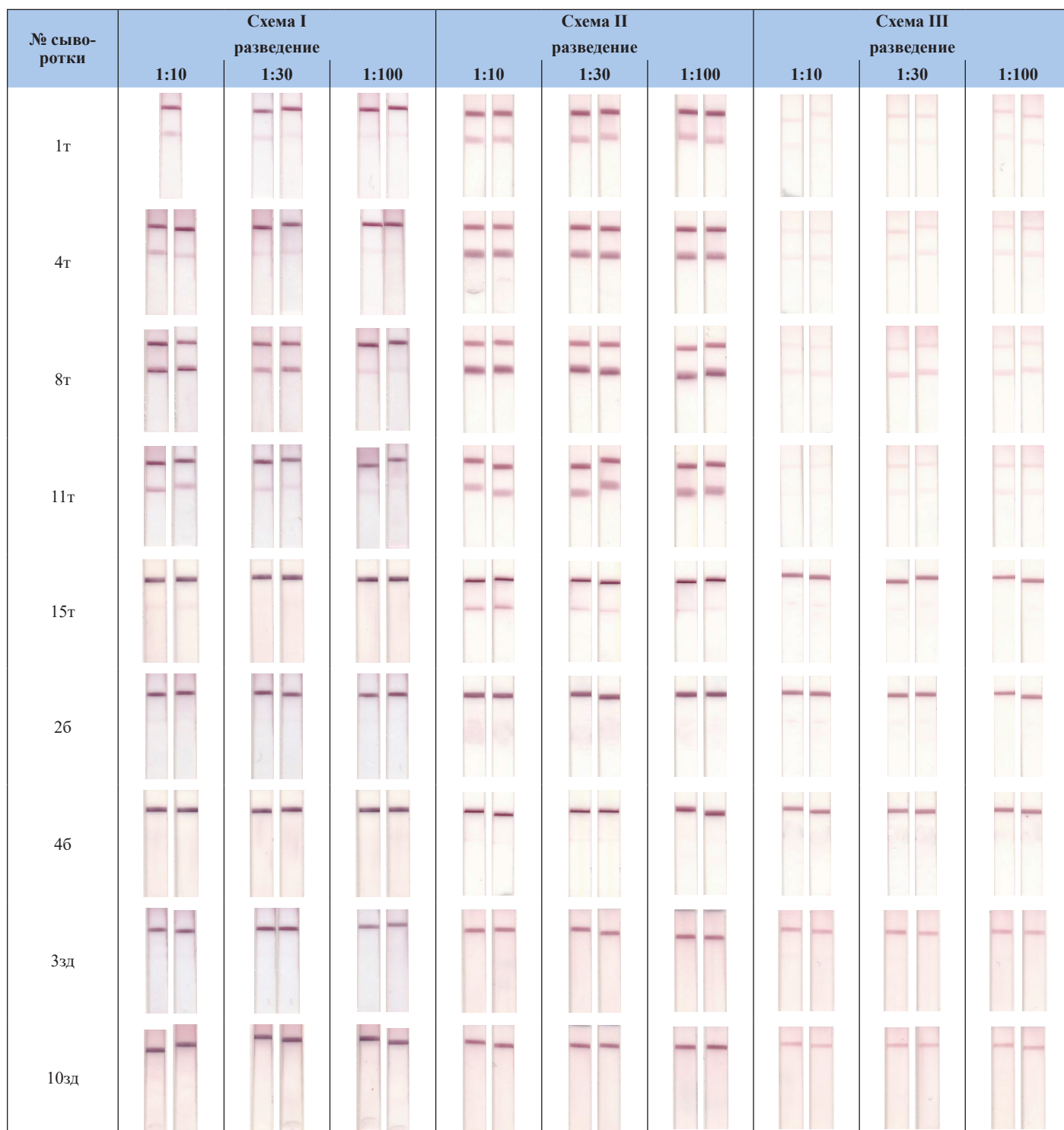


Рис. 4. Тестирование сывороток методом ИХ по схемам I, II и III: изображения аналитических и контрольных зон. Для каждой пробы использовали по две тест-полоски.

Таблица 3

Диагностическая эффективность трёх схем серодиагностики туляремии

Схема ИХ	I	II	III
Подтвержденный положительный результат	11	16	15
Ложноположительный результат	0	0	0
Подтвержденный отрицательный результат	15	15	15
Ложноотрицательный результат	5	0	1
Диагностическая чувствительность	68,75%	100%	93,75%
Диагностическая специфичность	75%	100%	93,75%

доли процента приходится на антитела, специфичные к антигену [26]. В результате большая часть иммуноглобулинсвязывающих белков блокируется неспецифическими иммуноглобулинами. Это блокирование снижает связывание метки в АЗ и затрудняет серодиагностику при низком содержании специфических антител [26].

Предложены два варианта проведения ИХ серодиагностики, исключающие блокирование связывающих центров на поверхности НЧЗ. Один из них состоит в «переворачивании» детектируемых комплексов: в АЗ иммобилизован иммуноглобулин-связывающий реагент, а с НЧЗ конъюгирован антиген [27-29] - см. схему III на рис. 1. Поскольку общая площадь поверхности пористой мембраны в АЗ значительно превышает предельно возможную для ИХ суммарную поверхность НЧЗ на тест-полоске [17], связывание в АЗ неспецифических иммуноглобулинов не препятствует формированию детектируемых меченых комплексов. При проведении ИХ может быть использована поливалентность антител. В этом случае антиген наносят как в АЗ, так и на поверхность НЧЗ. В результате в формировании детектируемых комплексов участвуют только специфические антитела - см. схему I на рис. 1, а остальные иммуноглобулины не влияют на результаты анализа [16,23,30].

Сравнение разных схем ИХ проводилось лишь в немногих исследованиях. В работе [17] при изучении серодиагностики COVID-19 показана наибольшая эффективность схемы III. Очевидно, что выявляемые тенденции не могут быть перенесены на все остальные задачи серодиагностики. В рамках данного исследования показано, что для серодиагностики туляремии наиболее эффективной оказалась схема II. Хотя ограниченное число доступных протестированных препаратов сывороток не позволяет провести строгий статистический сравнительный анализ, важным достоинством схемы II является значительно большая - для разведения 1:30 в среднем в 8 раз - интенсивность окрашивания АЗ, что облегчает визуальную оценку результатов тестирования. Отметим, что для схемы I возможно улучшение аналитической чувствительности при работе с меньшими разведениями проб (1:10), но оно сопровождается появлением ложноположительных результатов. Схема III, характеризуясь невысокими интенсивностями окрашивания, тем не менее, показала эффективность при работе со слабоположительными (ОП₄₅₀ в ИФА в интервале 0,2-0,3) пробами.

Заключение. Серодиагностика различных заболеваний имеет свои особенности, связанные со свойствами антигенов и с распределением по аффинности вырабатываемых специфических антител. Выводы о наилучшем формате ИХ серодиагностики конкретных инфекций можно сделать только на основе экспериментальных сравнений. Применительно к серодиагностике туляремии наибольшую эффективность показала схема с формированием комплексов антиген – специфические антитела – меченые антивидовые антитела.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1-8, 10-30 СМ.
 REFERENCES)

9. Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарёва Г.М., Куликалова Е.С., Бикетов С.Ф., Мазепа А.В. Сравнительное ис-

следование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуляремийных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018; 63: 630-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635.

REFERENCES

1. Sjostedt A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2007; 1105: 1–29. DOI: 10.1196/annals.1409.009.
2. Wawszczak M., Banaszczak B., Rastawicki W. Tularaemia – A diagnostic challenge. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2022; 29: 12–21. DOI: 10.26444/aaem/139242.
3. Hepburn M.J., Simpson A.J.H. Tularemia: Current diagnosis and treatment options. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2008; 6: 231–40. DOI: 10.1586/14787210.6.2.231.
4. Banada P., Deshpande S., Chakravorty S., Russo R., Occi J., Meister G. et al. Sensitive detection of *Francisella tularensis* directly from whole blood by use of the GeneXpert system. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55: 291–301. DOI: 10.1128/JCM.01126-16.
5. Shehit I.Yu., Kudryavtseva T.Yu., Mokrievich A.N., Biketov S.F. Detection of tularemia agent DNA by loop mediated isothermal amplification. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2022; 37: 202–8. DOI: 10.3103/S0891416822040085.
6. Ziegler I., Vollmar P., Knüpfer M., Braun P., Stoecker K. Reevaluating limits of detection of 12 lateral flow immunoassays for the detection of *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, and *Bacillus anthracis* spores using viable risk group-3 strains. *J. Appl. Microbiol.* 2020; 130: 1173–80. DOI: 10.1111/jam.14863.
7. Spletstoeser W., Guglielmo-Viret V., Seibold E., Thullier P. Evaluation of an immunochromatographic test for rapid and reliable serodiagnosis of human tularemia and detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in sera from different mammalian species. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1629–34. DOI: 10.1128/JCM.01475-09.
8. Chaignat V., Djordjevic-Spasic M., Ruettger A., Otto P., Klimpel D., Müller W. et al. Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 234. DOI: 10.1186/1471-2334-14-234.
9. Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Biketov S.F., Mazepa A.V. Comparative study of experimental and commercial serological tests for determining anti-tularemia antibodies in humans. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2018; 63: 630–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-630-635. (in Russian)
10. Boehringer H.R., O'Farrell B.J. Lateral flow assays in infectious disease diagnosis. *Clin. Chem.* 2022; 68: 52–8. DOI: 10.1093/clinchem/hvab194.
11. Rosati G., Idili A., Parolo C., Fuentes-Chust C., Calucho E., Hu L.M. et al. Nanodiagnosics to face SARS-CoV-2 and future pandemics: From an idea to the market and beyond. *ACS Nano.* 2021; 15: 17137–49. DOI: 10.1021/acsnano.1c06839.
12. Wang Z.X., Zhao J., Xu X.X., Guo L.L., Xu L.G., Sun M.Z. et al. An overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay. *Small Methods.* 2022; 6: 2101143. DOI: 10.1002/smt.202101143.
13. Abduljalil J.M. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: Available approaches and limitations. *New Microbes New Infect.* 2020; 36: 100713. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100713.
14. Su Z., Dou W., Liu X., Ping J., Li D., Ying Y. et al. Nano-labeled materials as detection tags for signal amplification in immunochromatographic assay. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2022; 154: 116673. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116673.
15. Zhu W., Meng K., Zhang Y., Bu Z., Zhao D., Meng G. Lateral flow assay for the detection of African swine fever virus antibodies using gold nanoparticle-labeled acid-treated p72. *Front. Chem.* 2022; 9: 804981. DOI: 10.3389/fchem.2021.804981.
16. Zhang Y., Chen Y., He Y., Li Y., Zhang X., Liang J. et al. Development of receptor binding domain-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay for the detection and evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibody in clinical sera samples compared with the conventional virus neutralization test. *Talanta.* 2023; 255: 124200. DOI: 10.1016/j.talanta.2022.124200.
17. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Xu Y., Dzantiev B.B. Comparison of three lateral flow immunoassay formats for the detection of antibodies against the SARS-CoV-2 antigen. *Biosensors.* 2023; 13: 750. DOI: 10.3390/bios13070750.

18. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics. *Sensors*. 2018; 18: 36. DOI: 10.3390/s18010036.
19. Byzova N.A., Zherdev A.V., Gorbato A.A., Shevyakov A.G., Biketov S.F., Dzantiev B.B. Rapid detection of lipopolysaccharide and whole cells of *Francisella tularensis* based on agglutination of antibody-coated gold nanoparticles and colorimetric registration. *Micromachines*. 2022; 13: 2194. DOI: 10.3390/mi13122194.
20. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 1973; 241: 20–2. DOI: 10.1038/physci241020a0.
21. Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Khlebtsov N.G., Dzantiev B.B. Advantages of highly spherical gold nanoparticles as labels for lateral flow immunoassay. *Sensors*. 2020; 20: 3608. DOI: 10.3390/s20123608.
22. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *J. Quant. Spectr. Rad. Trans.* 2010; 111: 1–35. DOI: 10.1016/j.jqsrt.2009.07.012.
23. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow serodiagnosis in the double-antigen sandwich format: Theoretical consideration and confirmation of advantages. *Sensors*. 2021; 21: 39. DOI: 10.3390/s21010039.
24. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ability of antibodies immobilized on gold nanoparticles to bind small antigen fluorescein. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24: 16967. DOI: 10.3390/ijms242316967.
25. Srivastav S., Dankov A., Adanalic M., Grzeschik R., Tran V., Pagel-Wieder S. et al. Rapid and sensitive SERS-based lateral flow test for SARS-CoV2-specific IgM/IgG antibodies. *Anal. Chem.* 2021; 93: 12391–9. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c02305.
26. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay. *Anal. Chem.* 2017; 89: 4419–27. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03635.
27. Wang C., Yang X., Gu B., Liu H., Zhou Z., Shi L. et al. Sensitive and simultaneous detection of SARS-CoV-2-specific IgM/IgG using lateral flow immunoassay based on dual-mode quantum dot nanobeads. *Anal. Chem.* 2020; 92: 15542–9. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03484.
28. Peng T., Sui Z., Huang Z., Xie J., Wen K., Zhang Y. et al. Point-of-care test system for detection of immunoglobulin-G and -M against nucleocapsid protein and spike glycoprotein of SARS-CoV-2. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 331: 129415. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129415.
29. Liu H., Dai E., Xiao R., Zhou Z., Zhang M., Bai Z. et al. Development of a SERS-based lateral flow immunoassay for rapid and ultra-sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG in clinical samples. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 329: 129196. DOI: 10.1016/j.snb.2020.129196.
30. Zhou Y., Chen Y., Liu W., Fang H., Li X., Hou L. et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot nanobead-based double-antigen sandwich lateral flow immunoassay and its clinical performance for the detection of SARS-CoV-2 total antibodies. *Sens. Actuators B Chem.* 2021; 343: 130139. DOI: 10.1016/j.snb.2021.130139.