



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92721 (13) C2
(51) МПК (2009)
C07K 16/12
G01N 33/537 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗБАГАЧЕНА ПОПУЛЯЦІЯ АНТИТІЛ, ВИСОКОСПЕЦИФІЧНИХ ДО АНТИГЕНУ ПОВЕРХНЕВОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЛІПОАРАБІНОМАНАНУ (LAM) МІКОБАКТЕРІЇ, СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ В ЗРАЗКУ ТА НАБІР ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МІКОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ІНФЕКЦІЇ

1

(21) а200701647
(22) 20.07.2005
(24) 10.12.2010
(86) PCT/US2005/025875, 20.07.2005
(31) 60/589,419
(32) 20.07.2004
(33) US
(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.
(72) КУЛЬЧИН ВЛАДІМІР А., US, МОЛОКОВА
ЄЛЕНА В., US, КЕРРІК ДЖІЛЬ Л., US
(73) ЧЕМОДЖЕН, ІНК., US
(56) WO A 0164237, 07.09.2001.
WO A 9734149, 18.09.1997.
US A1 2002034763, 21.03.2002.
WO A 9214155, 20.08.1992.
WO A 9726007, 24.07.1997.
Schwebach J. R. et al.: "Expression of a
Mycobacterium tuberculosis arabinomannan antigen
in vitro and in vivo", INFECTION AND IMMUNITY,
Sep. 2001, vol. 69, no. 9, September 2001 (2001-09),
pages 5671-5678, XP002358698, ISSN: 0019-9567.
Britton W. J. et al.: "Separate antigenic determinants
on cell wall associated carbohydrate antigens of
mycobacterium leprae defined with monoclonal
antibodies", INTERNATIONAL JOURNAL OF
LEPROSY AND OTHER MYCOBACTERIAL
DISEASES, vol. 54, no. 4, 1 December 1986 (1986-
12-01), pages 545-555, XP000673715, ISSN: 0148-
916X.
(57) 1. Збагачена популяція антитіл, високоспеци-
фічних до антигену поверхневого полісахариду
ліпоарабіноманану (LAM) мікобактерії, яку одер-
жують шляхом виключення антитіл, що впізнають
агент LAM, модифікований окисленням NaIO₄.
2. Збагачена популяція антитіл за п. 1, де антитіло
збагачують шляхом індукування в оточенні, що
підтримує антигенно-активний антиген.
3. Збагачена популяція антитіл за п. 1, де антитіло
збагачують за рахунок виключення антитіл, які
впізнають відносно неактивний антиген.
4. Збагачена популяція антитіл за п. 2, де антитіло
збагачують за рахунок виключення антитіл, які
впізнають відносно неактивний антиген.
5. Збагачена популяція антитіл за п. 1, де мікобак-
терію є *Mycobacterium tuberculosis*.

2

6. Спосіб одержання збагаченої популяції антитіл
високоспецифічних до антигену поверхневого по-
лісахариду мікобактерії, який включає:
а) забезпечення ізолюваної популяції антитіл до
вказаного антигену поверхневого полісахариду; і
б) видалення з вказаної популяції антитіл такої
популяції антитіл, які впізнають форму антигену
поверхневого полісахариду, модифіковану окис-
ленням NaIO₄.
7. Спосіб одержання збагаченої популяції антитіл,
високоспецифічних до антигену поверхневого по-
лісахариду мікобактерії, який включає:
а) нанесення сироватки з ссавця, зараженого мі-
кобактеріями, на перший афінний матрикс, приго-
товлений з використанням антигену поверхневого
полісахариду мікобактерії, так що антитіло, спе-
цифічне до зазначеного антигену поверхневого
полісахариду мікобактерії, утримується першим
афінним матриксом;
б) виділення антитіла, специфічного до зазначено-
го антигену поверхневого полісахариду, з першого
афінного матриксу;
в) нанесення виділеного антитіла на другий афін-
ний матрикс, приготовлений з використанням фо-
рми зазначеного антигену поверхневого полісахар-
иду мікобактерії, яка була модифікована за
допомогою окислювального агента NaIO₄, так що
антитіло, специфічне до модифікованої форми
зазначеного антигену поверхневого полісахариду,
утримується другим афінним матриксом, а антиті-
ло, що не має специфічності по відношенню до
модифікованої форми зазначеного антигену пове-
рхневого полісахариду, не втримується другим
афінним матриксом; і
г) збір незатриманих антитіл.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 6, 7, у якому мікобак-
терією є *Mycobacterium tuberculosis*.
9. Спосіб за п. 8, у якому поверхневим антигеном є
ліпоарабіноманан (LAM).
10. Спосіб за п. 7, у якому агентом є періодат на-
трію.
11. Спосіб за будь-яким з пп. 6-7, у якому поверх-
невий антиген виділений з ад'юванту Фрейнда.
12. Спосіб виявлення мікобактеріальної інфекції в
зразку, узятому в суб'єкта, який включає:

(13) C2
(11) 92721
(19) UA

створення імунореактивного оточення, такого як оточення, розроблене на основі збагаченої популяції антитіл за будь-яким з пп. 1-4;

проведення реакції зразка в імунореактивному оточенні з використанням збагачених антитіл за будь-яким з пп. 1-4 для того, щоб виявити мікобактеріальну інфекцію.

13. Спосіб за п. 12, у якому мікобактеріальною інфекцією є *M. tuberculosis*.

14. Спосіб за п. 12, у якому імунореактивне оточення включає ELISA.

15. Спосіб за п. 12, у якому мікобактеріальна інфекція є хворобою Джона.

16. Спосіб за п. 12, у якому мікобактеріальною інфекцією є легенева форма інфекції *Mycobacterium tuberculosis*.

17. Спосіб за п. 12, у якому мікобактеріальною інфекцією є позалегенева форма інфекції *Mycobacterium tuberculosis*.

18. Спосіб за п. 12, у якому зразком є будь-який з таких: мокротиння, кров, сеча, тканина або інший придатний зразок.

19. Спосіб за п. 12, у якому зразком є необроблена неконцентрована сеча.

20. Набір для виявлення мікобактеріальної інфекції в зразку, який включає аналіз, що забезпечує імунореактивне оточення, де оточення включає збагачену популяцію антитіл за будь-яким з пп.1-4.

21. Набір за п. 20, у якому імунореактивне оточення включає ELISA.

22. Набір за п. 20, у якому мікобактеріальною інфекцією є *Mycobacterium tuberculosis*.

23. Набір за п. 20, у якому імунореактивне оточення виконане у вигляді стрип-тесту.

Область техніки, до якої належить винахід

Даний винахід стосується діагностичних тестів для виявлення мікробних захворювань і станів, зокрема, діагностичних тестів та способів для виявлення туберкульозу.

Рівень техніки

Протягом останніх десятиліть туберкульоз (ТБ) перетворився з переважно легеневої інфекції на комплексну патологію із зростаючим числом позалегенових форм. Дотепер програми з ефективною профілактики ТБ ускладнені через відсутність швидкого та працюючого в польових умовах масового перевірконого аналізу. У країнах з високим рівнем доходів культивування мікобактерій залишається діагностичним стандартом, але є трудомістким і відносно дорогим. Ідеально, мікроскопія мокротиння, основана на трьох мазках мокротиння, дозволяє виявити до 67% культурально позитивних випадків. Повідомлялося, що супутня ВІЛ інфекція погіршує виявлення *Mycobacterium tuberculosis* у мокротинні, хоча деякі дослідники не повідомляли про який-небудь вплив серостатусу по ВІЛ на діагностику кислотостійких бацил (AFB). Високий відсоток позалегенового ТБ у AFB-позитивних ТБ пацієнтів додатково збільшує число AFB-негативних випадків ТБ. Це робить діагностику туберкульозу ще більше складною та підкреслює термінову необхідність удосконалення лабораторних методів для його діагностики.

Існуючі підходи для виявлення ТБ є недостатніми. Тест мокротиння для діагностики легеневого ТБ не завжди ефективний, особливо, якщо в мокротинні немає визначуваної бактерії, або зразок мокротиння не може бути одержаний. Крім того, даний діагностичний тест вимагає мікроскопії та/або культивування бактерій для підтвердження діагнозу, і жоден із цих способів не є особливо придатним для діагностики в польових умовах. Використання спинномозкової рідини для діагностики туберкульозного менінгіту також є проблематичним, особливо в польових умовах, оскільки, у черговий раз, для підтвердження діагнозу звичайно потрібні мікроскопія та/або культивування бактерій та/або ELISA аналіз.

Дослідження крові для діагностики ТБ також відомі, але мають низьку ефективність, будучи складними та недостовірними. Дослідження сечі простіші та більш достовірні, але існуючі способи вимагають обробки сечі перед здійсненням діагностичного аналізу - така обробка звичайно включає концентрування сечі.

Серед знов розроблених методів запропоновані тести з використанням антитіл проти ряду антигенів мікобактерій, але жоден із цих тестів дотепер не досяг необхідної специфічності для рутинної діагностики. Зниження чутливості при ВІЛ-позитивних випадках також є основним обмеженням. Існує інший підхід для оцінки імунної відповіді на специфічні антигени *Mycobacterium tuberculosis*, такі як ESAT-6, але дотепер диференціація між латентною формою ТБ інфекції та захворюванням ТБ не представляється можливою.

Туберкульоз є винятково складною патологією, що існує в можливих формах, але завжди починається як повітряно-краплинна інфекція. Легеневий туберкульоз виникає негайно при потрапленні мікроорганізму, а позалегеновий туберкульоз є результатом подальшого проникнення в організм пацієнта з найпоширенішими прикладами туберкульозного менінгіту та кісткового туберкульозу. Складність патології визначає велику кількість різних способів діагностики, випробуваних протягом цього сторіччя сучасною медициною. Крім того, клінічні та рентгенологічні прояви легеневого туберкульозу при супутній ВІЛ інфекції різко змінюються через імунодефіцит. Дані фактори істотно обмежують можливість ранньої симптоматичної діагностики туберкульозу у пацієнтів з ВІЛ/ТБ і, також, збільшують небезпеку передачі ТБ родичам і суб'єктам, що доглядають за таким пацієнтом.

Мікобактерії потенційно можуть бути витягнуті з різних видів клінічних зразків, включаючи проби з верхніх дихальних шляхів (мокротиння, бронхіальні змиви, бронхоальвеолярний лаваж, бронхіальні біопсії та інші); сечі, калу, крові, спинномозкової рідини (ЦСР), біопсії тканин і глибоких пункційних біопсій практично будь-яких тканин та органів. Ба-

ктеріальне культивування залишається золотим стандартом для діагностики туберкульозу, але воно може зайняти більше 6-8 тижнів для винесення заключного діагнозу. Існує три основних способи, що застосовуються для швидкої (більш швидкої, ніж бактеріальне культивування) діагностики мікобактеріальних інфекцій:

- Прямі мікроскопія мазків мокротиння;
- Аналізи, ґруновані на ПЛР;
- Імунодіагностичні способи.

Прямі мікроскопія мазків мокротиння. Більше сторіччя назад, Роберт Кох ідентифікував етіологічний агент туберкульозу шляхом його фарбування та культивування із клінічних зразків. На сьогодні, діагноз туберкульозу звичайно встановлюється при використанні методів фарбування та культивування, які по суті не відрізняються від тих, що застосовував Кох. Прямі мікроскопія мокротиння зараз є стандартом для діагностики туберкульозу в країнах, що розвиваються, і є еталонним тестом, відносно якого повинна бути визначена ефективність будь-якого нового тесту. Це є застосовним для легеневого туберкульозу, але не дуже ефективно для дітей або пацієнтів з початковими стадіями легеневого туберкульозу.

Аналізи, ґруновані на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Порівняльне вивчення ефективності ПЛР тестів у сімох лабораторіях показало високий рівень помилково позитивних результатів ПЛР, що коливається від 3% до 20% (з найбільшим 77% в одній лабораторії). Така відносно низька продуктивність є результатом недостатнього контролю кожної стадії способу та недооцінок необхідності більш ретельного якісного контролю під час проведення всіх стадій аналізу.

Імунодіагностичні способи

Шкірний тест на туберкульоз. Даний тест є, імовірно, найбільш старим імунологічним тестом на туберкульоз. Невелика кількість речовини, називаної ППД туберкулін, вводиться прямо під верхній шар шкіри на передпліччі за допомогою маленької голки. Тест оцінюють через 48-72 годин після введення речовини. Як правило, набрякання в 10 мм чи більше вважають позитивним результатом. Багато країн, що розвиваються, застосовують протитуберкульозне щеплення (БЦЖ) для захисту проти ТБ. Після вакцинації БЦЖ, шкірний тест із ППД звичайно стає позитивним. Результати шкірного тесту коливаються залежно від якості антигену ППД, реактивності імунної системи і, можливо, навіть від раси людини. Даний тест також не надає певних критеріїв, що стосуються стадії та локалізації інфекційного процесу.

Серологічні тести на *M. tuberculosis*. Даний спосіб, ґрунований на виявленні імунної відповіді антитіл на мікобактеріальні антигени, є одним із широко використовуваних у дослідницькому та клінічному середовищах. Всі серологічні тести мають приблизно однакові чутливість і специфічність у тому випадку, якщо використовуються очищені антигени. Чутливість найкращих тестів знаходиться в межах 80% для зразків, позитивних за мазком, і 60-70% для зразків, негативних за мазком. Надавана чутливість, як правило, вище і становить 95-100%.

Існуючі зараз способи мають наступні недоліки.

Для проведення досить широко розповсюдженого швидкого мікроскопічного тесту потрібно кілька годин, досвідчений лаборант і клінічне лабораторне приміщення. Інтерпретація даних дослідження є занадто важкою процедурою у порівнянні з діючими стандартами швидкої діагностики на місці (Point of Care, POC) для району інфекційних захворювань. Реальна вартість одного аналізу на одного пацієнта коливається в діапазоні 100-150 доларів у лікарнях США. Клінічна специфічність тесту є дуже гарною, але будь-які поліпшення специфічності будуть більш ніж бажаними.

Шкірний тест має достатню чутливість, але займає багато часу і не надає інформації щодо стадії патологічного процесу та недостатньо диференціює інфікованих і вакцинованих суб'єктів.

Серологічні тести звичайно не мають достатньої чутливості. Результати тесту змінюються залежно від змін індивідуальної імунної реактивності на антигени ТБ. Дані тести є практично незастосовними для ВІЛ пацієнтів, інфікованих *M. tuberculosis*. Даний фактор істотно обмежує їхню застосовність в африканських та багатьох азійських країнах. Крім того, у США дана група пацієнтів становить більшість пацієнтів, інфікованих ТБ.

Тести ПЛР широко застосовуються в розвинених країнах, але є складними, дорогими та не досить чутливими для виправдання їхнього застосування як перевірочних тестів в країнах, що розвиваються.

Кращий спосіб швидкої діагностики інфекційних захворювань ґрунований на виявленні бактеріального антигену в зразку пацієнта, що дає однозначний доказ активного інфекційного процесу, викликаного специфічним патогеном. Концепція застосування прямого антигенного тесту для виявлення мікобактеріальних інфекцій була описана в деяких публікаціях.

Наприклад, про розробку одного з перших прямих антигенних аналізів для *M. tuberculosis* повідомлялося в 1982 - радіоімунаналіз для виявлення антигенів *M. tuberculosis* у мокротинні пацієнтів з активним легеневою туберкульозом з використанням кролячих антитіл, специфічних до цільних клітин *M. bovis* (вакцина БЦЖ). Автоклавоване та оброблене ультразвуком мокротиння використовувалося як зразок. Аналіз виявляв антиген в 38 з 39 зразків мокротиння від пацієнтів з активним легеневою туберкульозом.

У більш пізніх дослідженнях описана розробка системи ELISA для виявлення мікобактеріальних антигенів у спинномозковій рідині пацієнтів з туберкульозним менінгітом, також з використанням антитіл, специфічних для цільних клітин *M. bovis*. Обидві системи демонстрували різке високу специфічність. Незважаючи на те, що LAM був основним антигеном, відповідальним за виявлення, повідомлялося, що *M. kansasii* продемонстрував перехресну реактивність в 5% випадків, і *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. fortitum* та *M. vaccae* перехресно відповідали лише в 2% випадків. Іншими описувалося виявлення способом ELISA мікобактеріального антигену в ЦР у дев'яти з 12 пацієнтів з туберкульозним менінгітом, що відпові-

дає чутливості 81,25%. Специфічність тесту становила 95%.

Практично всі попередні спроби розробки тесту для діагностики туберкульозу були спрямовані на виявлення легеневої форми захворювання. Позалегенові форми, які загальновідомо є важкими для діагностування, притягали відносно невелику увагу внаслідок низької поширеності порівняно з легеневою формою. До 1950-х та 1960-х, позалегенові випадки ТБ становили тільки близько 10% всіх випадків туберкульозу. Початок пандемії ВІЛ/СНІД повністю змінив дану ситуацію. Ці два захворювання в остаточному підсумку з'єдналися в нову комплексну проблему суспільної охорони здоров'я. На сьогоднішній день щонайменше у 60% нелікованих ВІЛ пацієнтів виявляється активний ТБ протягом їхнього життя та до 70% пацієнтів з ТБ є ВІЛ-інфікованими в Чорній Африці та Азії. Сполучення ВІЛ і ТБ змінило не тільки епідеміологію туберкульозу, але й перебіг самого захворювання. Протягом останніх десятиліть ТБ розвився з переважно легеневої інфекції на багатобічну патологію з постійно зростаючою перевагою позалегенових форм. Ці дані показують, що позалегенові випадки ТБ на сьогодні включають до 30% всіх випадків туберкульозу; дана цифра може бути навіть занижена через недовлік методів швидкого скринінгу та діагностування позалегенових форм туберкульозу. Крім того, навіть легеневий туберкульоз у ВІЛ-інфікованих пацієнтів часто проявляється атипічними симптомами. Наприклад, у таких пацієнтів мокротиння звичайно не виробляється. Дані фактори значно обмежують можливість раннього симптоматичного виявлення туберкульозу для пацієнтів із сукупною інфекцією ВІЛ/ТБ і також збільшують небезпеку перенесення ТБ родичам та особам, що доглядають за такими пацієнтами. Терміново необхідний простий у застосуванні скринінговий тест, здатний виявити широкий спектр патологій, обумовлених інфекцією *M. tuberculosis*, включаючи тест для позалегенових форм ТБ. Така необхідність обговорювалася протягом довгого періоду часу без успіхів у досягненні поставленої мети. На сьогоднішній день необхідність такого тесту для суспільної охорони здоров'я стала надзвичайною.

В інших випадках легеневої бактеріальної інфекції сучасний скринінговий спосіб вибору оснований на виявленні полісахаридних антигенів, секретованих у сечу пацієнта. Бактеріальні полісахариди складаються з моносахаридів, незвичайних для людей і, отже, стійких до розщеплення ферментами людини. Це уможливило їхню секрецію в сечу в імунохімічно інтактних формах, придатних для виявлення шляхом полісахарид-специфічного імуноаналізу. Надзвичайно низькі концентрації бактеріальних полісахаридів, секретованих у сечу, вимагають дуже високої чутливості імуноаналізу для застосування його як скринінгового способу.

Групи дослідників зі Швеції та Норвегії, що працюють у співробітництві, спробували розробити LAM-специфічну систему ELISA, здатну виявляти антиген LAM у сечі пацієнта. У системі використовувався принцип антигенної пастки для виявлення туберкульозу в сечі, оснований на ліпо-

арабіноманані, полісахариді, присутньому на поверхні *Mycobacterium tuberculosis* - мікроба, відповідального за розвиток туберкульозу у людей, як розкрито в заявці PCT WO97/34149, Svenson. Розкрита діагностична система виявляла наявність LAM у сечі пацієнта у 81,3% AFB-позитивних пацієнтів та у 57,4% AFB-негативних пацієнтів і демонструвала застосовність виявлення мікобактеріального антигену LAM для діагностики мікобактеріальних інфекцій. У той же час, розкрита система виявилася невдалою для скринінгових цілей. Незважаючи на застосування афінноочищеного кролячого поліклонального антитіла, специфічного до антигену LAM, система не мала достатньої чутливості при використанні необроблених неконцентрованих зразків сечі. Діагностична процедура займала приблизно 24-48 годин складних маніпуляцій у біохімічній лабораторії, пов'язаних з концентруванням сечі пацієнтів та її підготовкою для аналізу тестом ELISA. В цілому, чутливість аналізу по Svenson є недостатньою для практичного застосування даного способу. Складність і тривалість імуноаналізу також перешкоджають його практичному використанню як скринінгового тесту для виявлення мікобактеріальних інфекцій, оскільки він виявився занадто важким для застосування в клінічних умовах, де швидкість, легкість використання та висока чутливість є надзвичайно важливими для діагностичних тестів, застосовуваних для виявлення хворобливих станів.

Розкриття винаходу

У першому втіленні винахід пропонує антигенно-активну ізоформу ліпоарабіноманану з *Mycobacterium tuberculosis*, одержану шляхом окиснення LAM з використанням способів м'якого окиснення, як, наприклад, обробка низькими концентраціями NaIO_4 . В інших втіленнях, антигенно-активна ізоформа LAM, одержана методами помірного окиснення, застосовується для приготування високоспецифічних, високоочищених антитіл проти інактивованої мікобактерії, зокрема, проти поверхневих полісахаридів, таких як LAM, для виявлення полісахаридів (напр. LAM) у сечі, мокротинні, крові, тканині чи інших зразках від досліджуваного пацієнта. Інші втілення показують застосування високоспецифічного, високоочищеного антитіла, виробленого проти антигенно-активної форми LAM, для діагностики туберкульозу у досліджуваного пацієнта.

В іншому конкретному втіленні надається популяція збагачених антитіл, високоспецифічних до антигену поверхневого полісахариду мікобактерії. У даному втіленні, популяція збагачених антитіл може бути збагачена шляхом вироблення їх в середовищі, що містить антигенно-активний антиген. Альтернативно або додатково, антитіло збагачують шляхом видалення антитіл, які розпізнають відносно неактивний антиген. У деяких втіленнях, мікобактерією може бути *Mycobacterium tuberculosis*. Так само, поверхневим полісахаридом може бути ліпоарабіноманан (LAM).

В іншому втіленні винаходу пропонується спосіб одержання збагаченого антитіла, високоспецифічного до антигену мікобактерії. У даному втіленні, спосіб включає вироблення та виділення антитіла проти антигену мікобактерії; і відділення

від виділених антитіл тієї популяції антитіл, що є специфічною до відносно неактивного антигену, для приготування виділеного збагаченого антитіла.

В іншому втіленні запропонований спосіб одержання збагаченого антитіла, високоспецифічного до антигену мікобактерії. У даному втіленні, спосіб включає виділення антигену з мікобактерії в умовах збереження його антигенної активності; і вироблення антитіл проти ізольованого антигену, поки його антигенна активність збережена.

У ще іншому втіленні запропонований спосіб одержання збагаченого антитіла, високоспецифічного до антигену мікобактерії. В даному втіленні, спосіб включає нанесення сироватки крові ссавців, заражених мікобактеріями, на перший афінний матрикс, приготовлений з ізольованим антигеном з мікобактерії, при цьому антитіло, специфічне до виділеного антигену, утримується першим афінним матриксом; виділення антитіла, специфічного до виділеного антигену з першого афінного матриксу; нанесення виділеного антитіла на другий афінний матрикс, приготовлений з модифікованим антигеном з мікобактерії, при цьому таке антитіло, специфічне до модифікованого антигену, утримується другим афінним матриксом, у якому модифікований антиген оброблений речовиною для його деактивації по відношенню до ізольованого антигену; виділення збагаченого антитіла, специфічного до ізольованого антигену, шляхом збирання ефлюенту із другого афінного матриксу, внаслідок чого збагачене антитіло є більш високоспецифічним і виявляє більш високу чутливість до антигену мікобактерії, ніж незбагачене антитіло.

У наступних близьких втіленнях, мікобактерія може бути *Mycobacterium tuberculosis*, і поверхневий полісахарид може бути ліпоарабіномананом (LAM).

В інших втіленнях, речовиною для модифікування антигену з мікобактерії є періодат натрію. В інших близьких втіленнях, поверхневий полісахарид може бути виділений з ад'юванту Фрейнда.

Інше втілення надає спосіб виявлення мікобактеріальної інфекції в зразку, узятому із суб'єкта. В даному втіленні, спосіб включає забезпечення імунореактивного оточення, такого як оточення, утворене на основі збагаченого антитіла, як описано вище; і проведення реакції зразка в імунореактивному оточенні для виявлення мікобактеріальної інфекції.

Необов'язково, мікобактеріальною інфекцією може бути *M. tuberculosis* або хвороба Джона. Так само, поверхневим полісахаридом може бути ліпоарабіноманан (LAM). У наступних близьких втіленнях, імунореактивне оточення включає ELISA і може бути виконане у вигляді індикаторної смужки (стрип-тесту). У близьких втіленнях мікобактеріальна інфекція може бути легеневою формою інфекції *Mycobacterium tuberculosis* або позалегеневою формою інфекції *Mycobacterium tuberculosis*, і зразок може бути будь-чим з мокротиння, крові, сечі, тканини, або іншим придатним зразком. У близькому конкретному втіленні зразком може бути необроблена неконцентрована сеча.

Інші втілення пропонують набір для діагностики мікобактеріальної інфекції в зразку, набір, що

включає імунореактивне оточення для проведення аналізу, де оточення містить збагачене антитіло, як описано вище. У близьких втіленнях імунореактивне оточення включає ELISA, і може бути виконане у вигляді стрип-тесту. У наступних близьких втіленнях, мікобактеріальною інфекцією може бути *Mycobacterium tuberculosis* і антитілом може бути ліпоарабіноманан (LAM).

Короткий опис фігур

Для кращого розуміння викладених вище відмітних ознак винаходу нижче приводяться приклади здійснення винаходу з посиланнями на прикладені фігури, на яких:

Фігура 1 демонструє структурну модель мікобактеріальних ManLAM, PILAM та AraLAM.

Фігура 2 показує порівняння серологічної активності для експериментів з LAM.

Фігура 3 показує ефективність препаратів LAM-специфічного АТ у зв'язуванні при ELISA.

Фігура 4А. Чутливість LAM ELISA при різних концентраціях LAM у сечі. Границею відсікання була оптична густина негативного контролю + 0,1, що забезпечувало мінімальну межу чутливості в 0,25 нг/мл.

Фігура 4В. Зв'язування LAM-специфічних антитіл в ELISA з немікобактеріальними антигенами було виключено для таких бактеріальних видів: *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* 14/12F, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* 25923/43300, *Proteus vulgaris*, *E. coli* 8739, *Neisseria meningitidis* A/B/13102, *Haemophilus influenzae* A/B/D.

Фігура 4С. Чутливість LAM ELISA для різноманітних мікобактеріальних штамів. LAM *M. bovis* та *M. tuberculosis* виявлялися з найбільшою чутливістю.

Фігура 5. Кореляція між мікроскопічною щільністю мікобактерій AFB-позитивних пацієнтів і концентрацією їхнього антигену, вимірюваною LAM ELISA у необробленій сечі.

AFB + (світлова мікроскопія 1000× збільшення: 4-90 кислотостійких бацил/100 полей) 28 випадків.

AFB ++ (1-9/поле) 23 випадки.

AFB +++ (~10/поле) 20 випадків. Стовпчаста діаграма показує проценти 10, 25, 50, 75, 90 і середню концентрацію антигену.

Фігура 6 показує схему способу очищення антигену відповідно до конкретних втілень заявленої винаходу.

Фігура 7 показує схему приготування афінних колонок відповідно до конкретних втілень заявленої винаходу.

Фігура 8 показує схему способу очищення антитіл відповідно до конкретних втілень даного винаходу.

Фігура 9 показує схему приготування кон'югату відповідно до конкретних втілень даного винаходу.

Здійснення винаходу

Визначення

Наступні терміни будуть мати зазначені значення, якщо тільки інше не потрібно за контекстом:

Термін "імунореактивне оточення", у використуваному тут значенні, позначає оточення, призначене для імунологічних аналізів, імуних реакцій, імунохімії та будь-якого іншого способу, методу, методики чи системи, які включають, сто-

суються або ґрунтуються на імунологічній реакції для досягнення бажаного результату. Прикладами імунореактивних оточень є ті, що докладно описані Swanson et al. у патенті США 5073484; і Guire et al. у патентах США 5654162 та 6020147, що розкривають спосіб та пристрій для кількісного визначення досліджуваної речовини в розчині, де конкретні втілення використовують імунохімічні реакції, у яких досліджувана речовина та діюча речовина представляють різні частини специфічно зв'язаної пари ліганд (антиген) - антитіло (анти-ліганд). Ці патенти стосуються технології, реалізованої у вигляді, як ми називаємо в описі та формулі винаходу, "стрип-тест".

"Ад'ювант Фрейнда" фірми Sigma, США.

Нами розроблений високочутливий спосіб для виявлення антигенів мікобактерій, зокрема, антигенів *M. tuberculosis*, таких як поверхневі полісахариди ліпоарабіноманан (LAM) і споріднені види, у біологічних рідинах, які включають, без обмеження, сечу. Дотепер тести такого роду виявляли недостатню чутливість і були непридатними для необроблених зразків сечі або для виявлення позалегенових форм ТБ інфекції. Зокрема, ми розробили збагачені антитіла, які виробляються проти антигенів мікобактерій, де антитіло збагачується шляхом індукування в оточенні, що містить антигенно-активний антиген. Ми називаємо спосіб одержання даного першого класу збагаченого антитіла «прямий спосіб», який більш докладно описано далі.

Ми також розробили антитіло, яке збагачують шляхом видалення тих антитіл, що розпізнають відносно неактивний антиген. Спосіб одержання цього класу антитіл починається з "прямого способу" одержання збагачених антитіл, але потім також проводиться виключення антитіл, які впізнають відносно неактивний антиген. Ми називаємо спосіб одержання цього другого класу збагачених антитіл "спосіб збагачення", який також докладно описується нижче.

Фігура 8 є схематичним зображенням, що демонструє стадії практичного втілення способу збагачення. Оскільки спосіб збагачення ґрунтується на прямому способі, то Фігура 8 також ілюструє прямий спосіб, якщо зупинитися після першої колонки для афінної хроматографії.

Далі ми показуємо, як дані збагачені антитіла, кожне окремо або обидва разом, можуть застосовуватися для виявлення легеневої та позалегенової форм туберкульозної інфекції в різноманітних зразках, включаючи, без обмеження ними, необроблені (тобто, неконцентровані) зразки сечі. (Інші можливі джерела зразків включають мокротиння, спинномозкову рідину, кров, тканину, змиви). У прикладах, які наведені далі, збагачені антитіла виробляються проти епітопа ліпоарабіноманану (LAM) в оточенні, що зберігає його антигенну активність.

Попередні способи виявлення поверхневих полісахаридів (LAM), що використовують різні біологічні рідини, такі як сироватка крові, сеча або мокротиння, пророблені, але мають сумнівне підтвердження. У сироватці крові, виявлення LAM імовірно ускладнено через утворення імунних комплексів. Виявлення LAM у мокротинні можливо

тільки в зразках, взятих у пацієнтів з легеневою формою ТБ, оскільки позалегенові форми інфекції часто не супроводжуються утворенням мокротиння, що містить антигени мікобактерій. Попередні дослідження із сечею вимагали значних попередніх обробок і дій, обмежуючи такі процедури в польових умовах. Жоден з них не був ефективним для діагностування позалегенових форм мікобактеріальних інфекцій, наприклад, таких, що виникають у ВІЛ-інфікованих.

Втілення даного винаходу долають труднощі відомих способів шляхом надання збагачених антитіл, які можуть застосовуватися для виявлення антигенів мікобактерій в широкому спектрі різновидів зразків із суб'єкта. Дані різновиди зразків включають сироватку крові, кров, мокротиння, змиви, тканину та необроблену, неконцентровану сечу, поряд з іншими.

Ліпоарабіноманан (LAM) є ліпополісахаридом з молекулярною масою 17500, специфічним для роду мікобактерій. Ліпоарабіноманан є комплексним полісахаридним антигеном, що складається з манозного та арабінозного залишків, які формують сильно розгалужену та складну структуру. Незважаючи на більш ніж сорокарічні дослідження полісахаридних антигенів мікобактерій, у даних дослідженнях згадується тільки про фрагменти цих структур або структурних доменів і загальні моделі. Новітня загальна модель структури LAM представлена нижче на Фіг. 1.

Як частина зовнішньої клітинної стінки, LAM секретується з метаболічно активних або дегенеруючих бактеріальних клітин. Вважається, що в активній фазі ТБ інфекції LAM надходить в циркуляцію, проходячи через нирки і, таким чином, може бути виявлений у сечі, відображаючи рівень мікобактеріального обсіменіння. Оскільки LAM є вуглеводним антигеном із глікозидними зв'язками, для яких у людини не існує руйнуючих глікозидаз, то антиген присутній у сечі в інтактній формі.

Антиген LAM мікобактерії складається з трьох основних структурних доменів: манозилфосфатидил-міо-інозитол (MIP) якірного домену, що містить різну кількість жирних кислот з різною довжиною ланцюга, мананового корового полісахариду з різною кількістю манозних залишків; і розгалужених ланцюжків арабіанового полісахариду, зв'язаного з манановим ядром. Незважаючи на численні дослідження, зв'язування ділянки(нок) арабіанових ланцюжків з манановим ядром залишається невідомим. Ланцюжки арабіанового полісахариду покривають манозні олігосахариди, що складаються з моно-(α 1-2)-ди- і (α 1-2)-триманозильних одиниць, різних за довжиною (кепуючі мотиви). Рівень кепування міняється від штаму до штаму і, можливо, також залежить від умов росту.

Надзвичайно висока структурна складність і варіабельність мікобактеріального LAM спричиняє таку ж складність спектра антигенних епітопів. Складність вибраного діагностичного антигену підштовхнула нас до застосування афінно очищеного поліклонального антитіла як основного реагенту для імуноаналізу. Тільки застосування поліклонального антитіла дозволяє охопити разом весь спектр антигенних специфічностей, потенційно

зв'язаних з LAM, присутнім у клінічних зразках. Щоб домогтися максимально високої можливості для аналітичної чутливості сендвіч-аналізу, ми використовуємо високу концентрацію антитіла, специфічного до антигену, у зоні зв'язування і, крім того, мічене антитіло. Антиген-специфічне афінне очищення для приготування такого антитіла є відомим.

Для приготування колонки для афінної хроматографії, основаної на антигені, ми розробили спосіб виділення антигену та його пришивання на твердофазову основу. Спосіб виділення антигену LAM оснований, з деякими незначними модифікаціями, на способах виділення інших бактеріальних полісахаридів, описаних у літературі та добре відомих з рівня техніки, і описується нижче.

Попередній прямий антигенний імуноаналіз, оснований на визначенні LAM, описаний у літературі, полягав у використанні поліклонального антитіла, очищеного шляхом антиген-специфічної афінної хроматографії при використанні LAM-сефарозної колонки. Відомий з рівня техніки підхід до синтезу афінного матриксу був оснований на частковому NaIO_4 -окисненні полісахариду LAM з наступним приєднанням до NH_2 -сефарози. На наш подив, наші дослідження показали, що NaIO_4 -окиснення антигенну активність полісахариду LAM, як можна побачити з Фіг. 2.

Оскільки ефективність зв'язування окисненого полісахариду з NH_2 -твердою підкладкою перебуває в пропорційній залежності від ступеня окиснення, ми приєднували до сефарозної підкладки за допомогою функціонального BSA-спейсера молекулу антигену LAM, окиснену в 50 мМ NaIO_4 . При такому ступені окиснення полісахарид LAM ще зберігає певну антигенну активність, як показано нижче, але забезпечує високу ефективність зв'язування. Нанесення імунної сироватки на такий афінний матрикс приводить до виділення фракції кролячого антитіла з високим виходом. Тестування такого антитіла в стандартних планшетах для твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) з іммобілізованими антитілами показало певну функціональну активність, але не на рівні, достатньому для застосування у високочутливому імунохімічному аналізі, необхідному для скринінгу зразків у випадку використання неконцентрованих зразків сечі. Ці дані пояснюють результати, одержані раніше в літературі, де використовувалося LAM-специфічне афінно-очищене антитіло, але було необхідно концентрувати зразки сечі для виявлення LAM, присутнього в зразках.

Несподівана зміна хімічного способу зв'язування LAM на більш м'який неструктуривний спосіб, оснований на активації полісахариду бромистим ціаном (CNBr), привела до очищення LAM-специфічного антитіла набагато кращої якості, що можна побачити на Фіг. 3.

Крім того, несподіване пропускання антитіла, очищеного на колонці з інтактним LAM (CNBr-активування), через колонку з антигеном LAM, після глибокого інтенсивного відновлення NaIO_4 (див. нижче), приводило до одержання відносно невеликої частки антитіла, приблизно 7-10% від використовуваної кількості, з дуже високою активністю в LAM-специфічному прямому антигенному

імуноаналізі. Фіг. 3 демонструє ефективність такого антитіла при іммобілізації антитіла. Коли таке антитіло було помічене пероксидазою хрому (HRP) і застосовано як мічене антитіло, то також була продемонстрована більш висока активність, ніж у будь-якого іншого антитіла, тестованого або відомого. Спосіб ELISA, оснований на такому антитілі, показав дуже високу чутливість і довів придатність для тестування неконцентрованих зразків сечі. Це дозволило нам створити скринінговий LAM-специфічний імуноаналіз із технічними характеристиками, придатними для швидкого тестування в польових умовах для випадків як легеневого, так і позалегового ТБ, що раніше було нездійсненним. Таким чином, незважаючи на те, що повідомлялося про виявлення LAM у замороженій сечі ТБ пацієнтів, аналіз в описаних випадках має потребу у великій пробопідготовці і, отже, не є адаптованим для польових умов.

Протоколи

В даному розділі ми описуємо протоколи, придатні для здійснення "прямого способу" та "способу збагачення", описаних вище. Дане обговорення не розглядає строго по суті прямий спосіб і спосіб збагачення, але описує специфічні способи приготування колонок, придатних для застосування в будь-якому з двох способів або в обох разом, залежно від ситуації. Фігура 8 показує схему прямого способу та способу збагачення.

Виділення сухих клітин *M. tuberculosis* з ад'юванту Фрейнда

Спочатку флакони з ад'ювантом Фрейнда втримують для осідання клітин протягом мінімум 1 тижня при кімнатній температурі до початку використання. Забравши кришку із флакона з ад'ювантом і не порушуючи шару клітин, що осіли на дні флакона, видаляють всю кількість мінерального масла. Невелика кількість мінерального масла може бути залишена у флаконі як запобіжний захід для запобігання видалення клітинного осаду. Забирають мінеральне масло, потім змішують 6,0 л етанолу та 6,0 л діетилового ефіру і додають 5 мл суміші етанол:діетиловий ефір в кожен флакон.

Потім закривають флакон, перемішують на вортексі та швидко переносять суспензію в 1 л колбу Ерленмейера. На цьому етапі слід уникати повторного осідання клітин у флаконах. Коли 1 л колба Ерленмейера заповнена до лінії 1 л, дають клітинам осісти протягом 1-1,5 год. Потім обережно декантують розчин з колби Ерленмейера в чисту 1 л посудину. Слід уникати скаламучування осілих клітин та видалення їх разом з розчином. Якщо розчин, перелитий у посудину, є прозорим, його можна вилити. Якщо значна кількість клітин буде перелита з розчином, повертають вилитий розчин у колбу Ерленмейера та повторюють етап осадження. Використовуючи 20-30 мл аліквоти суміші етанол:діетиловий ефір, переносять клітини на фільтр із пористого скла.

Промивають клітини 500 мл суміші етанол:діетиловий ефір, потім промивають 200 мл діетилового ефіру. Потім клітини на фільтрі висушують на повітрі, при використанні вакууму 100 мм рт.ст. ± 10 (низький вакуум). Періодично перемішують і гомогенізують клітинну масу, потім покривають фільтр пористим матеріалом (напр., таким як без-

ворсові серветки) і залишають на фільтрі до висихання (приблизно на 15 годин, тобто, на ніч).

Зважують і записують загальну масу та розраховують масу сухих клітин. Потім щільно закривають гумовою пробкою та зберігають при температурі 15-30°C.

Фенольна екстракція неочищеного LAM антигену

Поміщають сухі клітини *M. tuberculosis* в 250-мл флакони з пірексного скла та додають до клітин теплу деіонізовану воду. Перемішують та обробляють суспензію імпульсами ультразвуку (імпульси по ~20 секунд) на ультразвуковій водяній бані до одержання гомогенної суспензії.

Клітини екстрагують фенолом, потім осаджують етанолом та осаджені клітини поміщають у холодильник (2-8°C) на ніч (~16 годин) для випадання осаду. Будучи дуже уважними, не порушуючи осад, акуратно видаляють супернатант доти, поки не залишиться близько 100 мл супернатанта, що покриває осад. Обережно перемішують і переносять суспензію, що залишилася, у тефлонові центрифужні пробірки та центрифугують при 12000 об./хв. протягом 20 хвилин. Видаляють якомога більше супернатанта з усіх пробірок без порушення осаду, додають 5 мл деіонізованої води в кожну пробірку і, використовуючи перемішування та імпульсний ультразвуковий вплив, розчиняють осад у воді. Поєднують всі фракції з розчиненням осадом і поміщають в 500-мл флакон (примітка: не перевищувати 1/10 об'єму флакона). Випарюють на роторному випарнику до мінімального об'єму, але уникають затвердіння зразка. Повторно розчиняють плівку в приблизно 50 мл води і повторюють висушування та повторне розчинення до висихання зразка 3 рази. Повторно розчиняють в 50 мл води та висушують.

Очищення антигену LAM за допомогою хроматографії на Sephadex G-25

Розчиняють 800 мг неочищеного антигену (АГ) LAM в 15 мл 0,25% розчину оцтової кислоти. Перемішують та обробляють ультразвуком в ультразвуковій бані для повного розчинення. Центрифугують у мікроцентрифузі при 5000 об./хв. протягом 5 хв. Збирають супернатант в 20-мл скляний флакон, розділяють супернатант на 3 еквівалентні частини для окремих хроматографічних аналізів, і потім обережно наносять 1/3 АГ LAM супернатанта, зібраного раніше, на хроматографічну колонку. Після того, як через колонку пройде 100 мл, починають збирання фракцій. Продовжують збирання фракцій доти, поки з початку хроматографії не пройде 350 мл рухомої фази. Закривають всі пробірки із фракціями та зберігають при 2-8°C. Випарюють на роторному випарнику в 250-мл флаконі для випарювання (об'єм не більш 25 мл). Випарюють до мінімального об'єму, але уникають затвердіння зразка. Розбавляють випарений матеріал 20 мл води, обробляють ультразвуком, перемішують до повного розчинення і потім ліофілізують (приблизно 8 годин). Збирають висушений матеріал за допомогою шпателя в попередньо зважену скляну пробірку та зважують.

Вищевикладені стадії схематично зображені на Фігурі 6.

Зв'язування антигену LAM з BSA-спейсером шляхом активації CNBr.

Спочатку готують розчини 0,5М бікарбонату натрію та 1М карбонату калію. Потім розчиняють 30,0 г очищеного АГ LAM в 1,5 мл деіонізованої води. Використовують обробку ультразвуком (імпульси по 10-20 сек) і перемішують до повного розчинення LAM АГ.

Розчиняють 300 мг BSA-гідразинного ліганду в 15 мл деіонізованої води. Обробляють імпульсами ультразвуку (імпульси по 10-20 сек) і перемішують на вортексі до повного розчинення, потім переносять у центрифужні пробірки та центрифугують протягом 10 хв. при 10000 об./хв. За допомогою пастерівської піпетки акуратно збирають прозорий супернатант із кожної пробірки та поєднують всі супернатанти в 20 мл флаконі. Уникають скаламучування осаду, що може утворитися. До флакону додають 1 мл 0,5М бікарбонату натрію та добре перемішують струшуванням. До розчину LAM додають 150 мкл охолодженого 1М карбонату калію та добре перемішують коротким струшуванням на вортексі. Поміщають одержаний розчин на льодяну баню (лід/вода).

Готують 5 мг/мл CNBr в ацетонітрилі для негайного використання і додають 180 мкл розчину бромистого ціану до розчину LAM. Перемішують на вортексі та поміщають на лід приблизно на 15 хв. Додають цей розчин до розчину BSA-гідразинного ліганду (див. вище) за допомогою пастерівської піпетки. Добре перемішують та інкубують протягом ночі (16-24 години) при 2-8°C у щільно закритій посудині.

Зв'язування антигену LAM з BSA-спейсером шляхом активації NaIO₄

Розчиняють антиген LAM в 1,25 мл деіонізованої води в 3-4 мл флаконі. Обробляють імпульсами ультразвуку та струшують на вортексі до повного розчинення. Готують 0,1М розчин періодату натрію: (в NaOAc буфері, pH 4,0). Додають 1,25 мл 0,1М розчину NaIO₄ до 1,25 мл розчину LAM. Перемішують на вортексі. Накривають флакон алюмінієвою фольгою, поміщають його на платформу шейкера для перемішування протягом 1 години + 5 хв. при кімнатній температурі. Розчиняють 250 мг BSA-гідразинного ліганду в 12,5 мл деіонізованої води в 25-40 мл скляному флаконі для сироватки. Використовують імпульси ультразвуку та перемішування на вортексі для повного розчинення, потім центрифугують приблизно 10 хвилин при 10000 об./хв. За допомогою пастерівської піпетки акуратно збирають прозорий супернатант із кожної пробірки та поєднують всі супернатанти в 25-40 мл скляному флаконі. Уникають скаламучування осаду. Додають у флакон 12,5 мл 0,1М фосфату натрію (pH 6,8) і добре перемішують коротким струшуванням на вортексі.

Спосіб зв'язування:

До BSA-гідразинного розчину додають окиснений розчин LAM і перемішують. Додають 100 мг ціаноборогідриду натрію та закривають. Відбирають 10 мкл кінцевого розчину та розбавляють 90 мкл 1× PBS буфера (QC розчин) і зберігають для подальших аналізів (концентрація LAM буде становити приблизно 0,75 мг/мл).

Активация сепарозы за допомогою NaIO₄

Відміряють аликвоту суспензії сефарози 4B-CL, що відповідає 80 мл осілого гелю, і переносять на фільтр із пористого скла. Промивають 500 мл води та висушують, використовуючи низький вакуум (близько 300 мм рт. ст.), доти, поки не виявиться зерниста структура гелевої поверхні. Уникають утворення повітряних тріщин на гелевому шарі. Готують 0,1М буферний розчин ацетату натрію, pH 4,0, і використовують його для приготування 30мМ розчину NaIO_4 в 0,1М NaOAc .

Додають до гелю 250 мл 30 мМ NaIO_4 і ретельно перемішують. Покривають суміш у флаконі алюмінієвою фольгою та поміщають на шейкерну платформу з кутом 45° при середній швидкості на 1,5 години \pm 10 хвилин при температурі навколишнього середовища. Переносять на фільтр із пористого скла та відмивають 1 л води з використанням низького вакууму (близько 300 мм рт.ст.). Активованій гелю повинен бути приготовлений максимум за 4 години до використання.

Зв'язування BSA-LAM ліганду з активованою сефарозою (для синтезу першої та другої афінних колонок)

Приготування матриксу

Готують 0,1% розчин азиду натрію в 1× PBS (фосфатно-буферний сольовий розчин). Відміряють об'єм суспензії активованої сефарози, що відповідає 60 мл осілого гелю (або іншого придатного матриксу), і переносять на фільтр із пористого скла. Висушують гелю, використовуючи низький вакуум (300 мм рт.ст.), доти, поки гелю не ущільниться та не стане видна його зерниста структура, але уникають утворення тріщин на поверхні гелю.

Розчин ліганду BSA-LAM:

Приблизно 17-20 мл розчину ліганду BSA-LAM розбавляють натрій-фосфатним буфером (pH 6,8) в 250-мл середній колбі до 90 мл. Додають до розчину 90 мг кристалічного ціаноборогідриду натрію. Щільно закривають колбу, використовуючи для цього відповідну пластмасову пробку. Добре змішують шляхом короткого перемішування на вортексі. Розчин може опалесциувати, однак він не повинен містити осаду. Можуть бути помітні мікроскопічні бульбашки газу, утворені ціаноборогідридом натрію.

Стадія зв'язування:

До розчину LAM, приготовленому, як описано вище, додають підсушений активований гелю сефарози. Щільно закривають і ретельно змішують суспензію, використовуючи м'яке перемішування. Інкують приблизно 4 години при температурі $37 \pm 2^\circ\text{C}$, перемішують (шляхом перекидання) реакційну суміш щогодини. Додають 4,5 мл 1,5М Tris буфера та знову щільно закривають пробку. Продовжують інкубацію при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом близько 16 годин (всю ніч).

Переносять реакційну суміш на фільтр із пористого скла та збирають рідку фазу в чисту 100-200 мл колбу Бунзена при використанні низького вакууму (300 мм рт.ст.). Промивають LAM-сефарозний гелю 400 мл деіонізованої води на фільтрі та продовжують промивання 600 мл 1× PBS.

Заповнення та зберігання колонки:

До приготовленого гелю в 250 мл лабораторну склянку додають 100 мл 1× PBS. Перемішують

вручну до утворення суспензії. Гелю вносять на колонку відповідно до стандартних способів, використовуючи 1× PBS. Урівноважують колонку 1× PBS, що містить 0,1% азиду натрію.

Загальна схема зв'язування ліганду LAM з активованою сефарозою (для приготування I та II афінних колонок)

Відміряють об'єм суспензії активованої сефарози, що відповідає 100 мл осілого гелю, і переносять на фільтр із пористого скла. Висушують гелю при використанні низького вакууму (300 мм рт.ст.) до того, як гелю ущільниться та зерниста структура гелю не стане видна, але уникають утворення тріщин на поверхні гелю. Залишають підсушений гелю для наступного застосування.

Розчин BSA-LAM ліганду:

Натрій-фосфатним буфером (pH 6,8) розводять до 100 мл приблизно 27,5 мл розчину ліганду BSA-LAM в 250 мл флаконі з пірексу. До розчину додають 100 мг кристалічного ціаноборогідриду натрію. Щільно закривають флакон, використовуючи придатну пластмасову пробку. Добре перемішують шляхом короткого струшування при використанні вортексу. Розчин може опалесциувати, однак він не повинен містити осаду. Можуть бути помітні мікроскопічні бульбашки газу, утворені ціаноборогідридом натрію.

Стадія зв'язування:

До розчину LAM, приготовленого, як описано вище, додають підсушений активований гелю сефарози. Щільно закривають відповідною пластмасовою пробкою. Ретельно змішують суспензію, використовуючи м'яке перемішування (середня швидкість) та інкують близько 4 годин при температурі $37 \pm 2^\circ\text{C}$, перемішують реакційну суміш (шляхом перекидання) щогодини. Додають 7,5 мл 1,5М Tris буфера та щільно закривають. Продовжують інкубацію при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом близько 16 годин (всю ніч).

Переносять реакційну суміш на фільтр із пористого скла та збирають рідку фазу в чисту 100-200 мл колбу Бунзена при використанні низького вакууму (300 мм рт.ст.). Промивають LAM-сефарозовий гелю на фільтрі приблизно 800 мл деіонізованої води. Продовжують промивання приблизно 1,2 л 1× PBS.

Заповнення та зберігання колонки:

До приготовленого гелю в 250 мл лабораторній склянці додають приблизно 160 мл 1× PBS. Перемішують вручну (шпателем/скляною паличкою) до утворення суспензії. Заповнюють колонку у відповідності зі стандартними способами, використовуючи 1× PBS. Урівноважують колонку 1× PBS, що містить 0,1% азиду натрію.

Вищеописані стадії, що включають застосування очищеного LAM і приготування афінних колонок I та II, схематично зображені на Фігурі 7.

Виділення антитіла за допомогою афінної хроматографії - I ("Прямий спосіб").

Готують такі маточні розчини:

1 літр 0,1М гліцинового буфера та доводять pH до 2,5 за допомогою 1М HCl.

1 літр 3× PBS розчину (розбавляють 10× PBS вихідний розчин деіонізованою водою) та перевіряють pH і, при необхідності, повторно доводять до 7,2-7,4 за допомогою 1М HCl або 1М NaOH.

200 мл 1× PBS, що містить 0,1% розчин азиду натрію.

100 мл 0,5M розчину динатрійфосфату (Na_2HPO_4)

Приготування сироватки

Повільно розморожують заморожену сироватку в холодильнику (близько 16 годин/всю ніч) до повного розморожування. Вимірюють об'єм сироватки та зважують 2,9 г хлориду натрію на кожні 100 мл сироватки і додають до неї. Акуратно перемішують обертовими рухами до повного розчинення: кінцева концентрація повинна становити 0,5M NaCl.

Центрифугують (4-8°C) при $\sim 8000 \times g$ протягом 20 хвилин, пастерівською піпеткою видаляють супернатант із всіх центрифужних пробірок. Не порушують осад. Фільтрують супернатант через лійку, закриту ватною пробкою, і збирають фільтрат. Зібраний фільтрат повинен бути злегка опалесцентним, але не повинен містити ніяких частинок осаду. Поміщають профільтовану сироватку в холодильник до використання.

Нанесення сироватки на колонку:

Готують колонку I (не модифікований LAM, приєднаний до матеріалу колонки) для нанесення сироватки шляхом урівноважування з 1× PBS. Установлюють швидкість потоку 2,0 мл/хв. і продовжують промивання 1× PBS доти, поки нульова базова лінія не буде залишатися на постійному рівні протягом щонайменше 1 години. Установлюють нульову відмітку для самописа та детектора, як необхідно. Як тільки нульова лінія стане постійною, установлюють швидкість потоку до 0,5-0,6 мл/хв, і потім наносять сироватку, приготовлену раніше, на LAM афінну колонку I при швидкості потоку 0,5-0,6 мл/хв. Збирають вільний об'єм елюенту (який повинен становити приблизно 30% об'єму колонки). Здійснюють контроль фракцій за допомогою УФ детектування при довжині хвилі 260-280 нм і, коли сигнал збільшується, починають збирання сироватки, пропускаючи через колонку 500-1000 мл сироватки. Після того, як весь об'єм сироватки нанесений на колонку, короткочасно зупиняють протікання через колонку, вводять 3× PBS буфер, і потім відновлюють течію рідини. Продовжують промивати колонку 3× PBS до зменшення сигналу приблизно на 50% від нульової лінії. В цей момент припиняють збирання сироватки та зберігають всі зібрані фракції. Змінюють швидкість потоку до 2,0 мл/хв. і продовжують промивати колонку PBS доти, поки нульова лінія не стане приблизно 10-15%. Елюат викидають. Заміняють 3× PBS буфер на 1× PBS буфер і промивають приблизно 2-2,5 об'ємами колонки при швидкості потоку 2,0 мл/хв. Елюат викидають.

Стадія елювання антитіл:

Установлюють швидкість потоку 1,0 мл/хв. Заміняють 1× PBS на охолоджений 0,1M Gly-HCl буфер, приготовлений раніше, і починають елювання антитіл, що зв'язалися. Коли сигнал швидко збільшиться та досягне близько 10-15% повної шкали, починають збирання елюату в 15 мл конічні пробірки, поміщені на льодяну баню (0°C). Збирають фракції по 5 мл.

Продовжують збирання антитіл в Gly-HCl буфері доти, поки сигнал не почне швидко зменшуватися. Припиняють збирання фракцій в той момент, коли сигнал впаде до рівня сигналу на початку збирання (10-15% повної шкали). Нейтралізують зібраний розчин антитіл шляхом додавання до кожної 5-мл фракції 0,5 мл 0,5M Na_2HPO_4 із кроком 0,1 мл. Загальний доданий об'єм повинен становити 10% об'єму фракцій до нейтралізації.

В процесі додавання Na_2HPO_4 буфера розчин акуратно перемішують і поєднують нейтралізовані фракції. Вимірюють оптичну густину (OD) антитіл при довжині хвилі 280 нм по відношенню до контрольної проби, що містить тільки 0,1M Gly-HCl буфер, і розраховують концентрацію антитіл. Залишають антитіла, зібрані при 2-8°C, мінімум на 3 дні для осідання ушкоджених антитіл.

Догляд за колонкою:

Урівноважують колонку 1× PBS до нейтрального pH (pH 7). Під час зберігання урівноважують колонку 1× PBS з 0,1% розчином азиду натрію та зберігають колонку при температурі 4-8°C до наступного використання.

Діаліз

Центрифугують приготовлені антитіла при $10000 \times g$ протягом мінімум 5 хвилин. Переносять супернатант у діалізну трубку з порогом відсікання по мол.вазі 12-14 кДа та проводять діаліз проти 1× PBS протягом 2-3 днів з 4-разовою заміною буфера, при цьому співвідношення розчину антитіл до загального об'єму становить $\geq 1:20$. Видаляють антитіла з діалізної трубки. Вимірюють об'єм розчину антитіл за допомогою скляного мірного циліндра. У випадку, якщо там присутні які-небудь додаткові зруйновані/порушені (у вигляді осаду), розчин антитіл знову центрифугують при $10000 \times g$ протягом мінімум 5 хвилин. Вимірюють оптичну густину (OD) антитіл при 280 нм після встановлення нуля спектрофотометра по 1× PBS буферу. Розраховують концентрацію в мг/мл і поміщають на зберігання при 4-8°C.

Виділення антитіла шляхом афінної хроматографії - II ("Спосіб збагачення")

Очищення високоспецифічних антитіл

Пропускають 1× PBS через LAM афінну колонку 2, приготовлену раніше (LAM, модифікований шляхом сильного окиснення, з'єднаний з матеріалом колонки при використанні NaIO_4), при швидкості потоку 2,0 мл/хв. поки нульова лінія не стане постійною протягом, щонайменше, 15 хвилин. Установлюють самопис і детектор на нульовій відмітці, як це необхідно. Продовжують контролювати нульову лінію протягом наступних 30 хвилин і, як тільки вона стане постійною, наносять антитіла на колонку. Установлюють швидкість потоку 0,5-0,6 мл/хв. і наносять об'єм антитіла, приготовленого раніше, що відповідає ~ 100 -150 мг АТ на LAM афінну колонку 2, застосовуючи перистальтичний насос Ecpo або аналогічний пристрій. Збирають вільний об'єм елюату (який буде становити приблизно 30% об'єму колонки), контролюючи OD при 280 нм. Починають збирання антитіл у той момент, коли сигнал збільшиться на ~ 10 -15% вище нульової лінії, у чистий флакон для сироватки. Коли весь об'єм антитіл буде нанесений, коротко-

часно зупиняють потік рідини, наносять 1× PBS буфер і відновлюють потік рідини при 0,5-0,6 мл/хв. Продовжують збирати матеріал, що проходить через колонку, контролюючи OD при 280 нм. Коли сигнал дійде до 10-15% вище початку збирання (30-50% вище нульової лінії), зупиняють збирання розчину.

Вимірюють OD високоспецифічних антитіл при 280 нм і розраховують концентрацію антитіл. Негайно поміщають розчин антитіл для тимчасового зберігання при 4-8°C.

Промивання колонки

Продовжують промивання колонки 1× PBS при швидкості потоку 2,0-2,5 мл/хв. Пропускають як мінімум 3 об'єми колонки 1× PBS. Елюють матеріал, адсорбований на колонці, охолодженим 0,1M Gly-HCl буфером, приготуваним вище. Збирають елюований матеріал у скляні флакони. Коли контрольний сигнал знизиться до ~10-15% від нульової лінії, зупиняють збирання. Нейтралізують зібраний розчин антитіл шляхом додавання 10% від загального об'єму 0,5M фосфату натрію, приготовленого раніше, додаючи по 0,5 мл. Вимірюють OD антитіл при 280 нм і розраховують концентрацію антитіл. Відразу ж поміщають зібраний розчин антитіл при 4-8°C і залишають доти, поки буде завершений аналіз антитіл, зібраних на вищевказаній стадії. Якщо концентрація вищевказаних антитіл становить менше 0,3 мг/мл, концентрують.

Промивають колонку 1× PBS, мінімум 3 об'ємами колонки, при швидкості потоку 2,0-2,5 мл/хв. Колонку промивають знову 1× PBS з 0,1% азидом натрію, 1 об'ємом колонки, і зберігають при 4-8°C до наступного використання.

Вищевикладені стадії, що демонструють виділення збагачених антитіл на афінних колонках I та II за допомогою застосування прямого способу та способу збагачення, схематично представлені на фігурі 8.

Спосіб сенсibilізації планшетів для ELISA.

Пристрій системи Moduline 300 System

Сенсibilізація антитілами повинна бути завершена не пізніше 8 годин з моменту закінчення приготування сенсibilізуючого розчину M815. Сенсibilізуючий розчин антитіл повинен зберігатися на льоду (0°C) протягом процесу іммобілізації.

Перша стадія

Попередньо порівнюють і ретельно оглядають порожні планшети та забирають будь-які зіпсовані планшети. Розливають по 100 мкл MTB-LAM специфічного сенсibilізуючого розчину AT в кожну лунку кожного ряду планшета, застосовуючи Moduline 300 System. Візуально перевіряють всі 96 лунок у кожному планшеті для забезпечення рівномірності заповнення лунок під час процесу іммобілізації. Зберігають невикористаний розчин AT і зберігають при 2-8°C доти, поки не оброблять і не витратять весь набір планшетів. Укладають планшети з розлитими AT в стопки по 10 планшетів у кожній та накривають верхній планшет порожнім планшетом, який використовується як кришка. Підписують кожен планшет, що накриває набір, цифрами від 1 до 18. Охолоджують набори планшетів при 2-8°C та інкубують всю ніч (14-18 годин).

Друга стадія:

Установлюють Moduline 300 System на проведення 3-х циклів промивання з наступним негайним проведенням зупинного циклу 312 мкл блок-розчину. Блок-розчин повинен бути застосований протягом максимум 24 годин з моменту завершення приготування.

Збирають планшети з холодильника і забирають накривні планшети з наборів у тому порядку, як вони були поміщені на Moduline, та відкладають їх убік. Встановлюють таймер на 6 годин. Установлюють блокувані планшети, що надійшли з конвеєра, на послідовні пронумеровані підставки та блокують протягом 5-6 годин при температурі навколишнього середовища (20-28°C).

Поміщають планшети на підставках у сушильну камеру та інкубують при 20-23°C і відносній вологості повітря 20-22% протягом 24-72 год. Виймають сухі планшети із сушильної камери.

Приготування MTB-AT для кон'югації з пероксидазою хрому (HRP)

(Приготування розчину MTB-AT повинно бути здійснене, щонайменше, за 7 днів до процедури кон'югації).

Діаліз:

Проводять діаліз необхідної кількості розчину MTB-LAM-AT проти 1× PBS протягом мінімум 48 год. з мінімум 4 замінами при 2-8°C. Використовують діалізні трубки з відсіканням по молекулярній вазі 12000-14000. Після діалізу центрифугують розчин AT при 12000 об./хв. протягом 10 хв., і акуратно переносять супернатант в 15 мл градуйовані центрифужні пробірки.

Вимірюють OD розчину AT після діалізу при 280 нм і розраховують концентрацію AT після діалізу. Якщо розчин AT після діалізу має $OD_{280nm} > 2,8$, розбавляють розчин AT 1× PBS у співвідношенні 1:7.

Концентрування:

Промивають пристрій фільтрів для центрифугування Amicon Ultrafree-15 1× PBS. Поміщають приблизно 15 мл розчину 1× PBS у пристрій і центрифугують при 3500 об./хв. протягом приблизно 5 хв. Видаляють весь розчин з елементів пристрою. Концентрують вищевказаний розчин AT після діалізу за допомогою пристрою фільтра для центрифугування Ultrafree-15 до 4,5-5,5 мг/мл шляхом центрифугування на настільній центрифугі (бакет-ротатор) при 3500 об./хв. протягом близько 5 хв., трічі. Акуратно видаляють концентрований розчин AT з фільтруючого елемента пристрою Amicon в 15 мл пробірку. Для максимального збирання, видаляють концентрований зразок відразу ж після центрифугування та ресуспендують концентрований об'єм кілька разів за допомогою піпетки для забезпечення оптимального перемішування та видалення AT.

Центрифугують концентрований розчин AT при 10000 об./хв. протягом близько 15 хв. і переносять супернатант з AT в 15 мл пробірку. Вимірюють OD_{280} розчину AT при розведенні 1:20 1× PBS і розраховують концентрацію AT.

Відбирають 0,1 мл розчину AT для аналізу методом ELISA. Зберігають при 2-8°C.

Приготування кон'югату MTB-LAM-AT-HRP

Промивають всі скляні пробірки і магнітні мішалки для стадії кон'югації та скляні пробірки для

зберігання кон'югату розчином H_2SO_4 та ретельно прополіскують їх водопровідною водою та деіонізованою H_2O .

Приготування колонки Sephadex G-25 для хроматографії:

Беруть колонку (1,5×30 см) із приблизним $V=50$ мл, заповнену Sephadex G-25 (Fine). Заповнюють колонку, як описано вище. Установлюють наступні умови хроматографії для урівноважування колонки 1 мМ ацетатом натрію:

- Ацетатний буфер, pH 4,4.
- УФ проточний спектрофотометр із довжиною хвилі 280 нм
- Чутливість спектрофотометра: 0,2 OD
- Швидкість реєструючого записуючого пристрою: 2 мм/хв.
- Швидкість подачі рідини для промивання колонки: 60 мл/год.

Промивають колонку приблизно 100-150 мл 1 мМ ацетату натрію, pH 4,4, і встановлюють базову лінію УФ спектрофотометра на нульову позицію. Стежать за тим, щоб установлена базова лінія залишалася незмінною протягом близько 30 хв. Розраховують кількість розчину MTB-LAM-AT, необхідного для кон'югації, і центрифугують AT при 12000 об./хв. протягом приблизно 10 хв. Акуратно збирають супернатант AT у чисту скляну пробірку. Вимірюють $\text{OD}_{280\text{nm}}$ розчину AT у розведенні 1:20 1× PBS і розраховують концентрацію нерозведеного розчину AT. Зберігають розчин AT при 2-8°C до використання.

Окиснення HRP (пероксидази хрону) з використанням NaIO_4 :

Зважують 8 мг HRP у V-подібній скляній пробірці. Додають 2,0 мл деіонізованої H_2O . Обережно перемішують розчин протягом близько 2-3 хв. для того, щоб HRP розчинилася. Стежать за тим, щоб не залишалося нерозчинених частинок HRP на стінках скляної пробірки.

Готують свіжий розчин 0,1M NaIO_4 , pH 4,4, для використання протягом 5 хвилин та охороняють від потрапляння світла. Додають 0,4 мл 0,1M NaIO_4 до розчину HRP, приготовленого раніше, при перемішуванні. Закривають пробірку алюмінієвою фольгою для захисту суміші від потрапляння світла. Інкують суміш протягом 20 хв. при перемішуванні при температурі навколишнього середовища. До реакційної суміші додають 4 краплі етиленгліколю та перемішують приблизно 2 хв.

Хроматографія та концентрування окисненої HRP:

Негайно після завершення стадії 5.4.7 очищають окиснену HRP шляхом гель-фільтрації на колонці Sephadex G-25 (Fine). Установлюють швидкість потоку рідини для елюції зразка приблизно 50 мл/год. Ретельно переносять загальний об'єм окисненої HRP, приготовленої раніше, на шар підсушеного гелю, але при цьому стежать за тим, щоб шар гелю не порушувався. Не допускають висихання гелю. Збирають весь окиснений розчин HRP (забарвлений розчин) в одну 15 мл пробірку - перший пік на хроматографічній діаграмі ($\text{OD}_{280\text{nm}} > 0,05$). Після завершення хроматографії, очищають колонку Sephadex G-25, викидають гель і записують об'єм розчину HRP після хроматографії.

Концентрування окисненої HRP

Попередньо промивають пристрій фільтра для центрифугування Ultrafree-15 1 мМ ацетату натрію, pH 4,4, приблизно 15 мл 1 мМ ацетату натрію, pH 4,4, і центрифугують фільтруючий елемент протягом приблизно 5 хв. при 3500 об./хв. за допомогою настільної центрифуги (бакет-ротатор). Потім видаляють всі розчини з фільтруючого елемента. Негайно після хроматографії концентрують окиснений розчин HRP (вищевказаний) до близько $2 \pm 0,2$ мл за допомогою фільтра для центрифугування Ultrafree-15 (мембранний фільтр Біотак-10K) шляхом центрифугування при 3500 об./хв. протягом приблизно 5 хв. Ретельно збирають концентрований розчин HRP з фільтруючого елемента пристрою в чисту скляну пробірку, вимірюють і записують об'єм і зберігають при 2-8°C.

Кон'югація HRP з MTB-LAM-AT

Розраховують об'єм розчину MTB-LAM-AT, необхідний для кон'югації з HRP. Поміщають MTB-LAM-AT (вищевказаний) до V-подібної скляної пробірки з трикутною магнітною мішалкою, не залишаючи розчин AT на стінках пробірки. Додають 1/2 об'єму окисненого розчину HRP (вищевказаного) до розчину MTB-LAM-AT, закривають пробірку алюмінієвою фольгою для захисту реакційної суміші від світла та перемішують реакційну суміш у скляній пробірці протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Уникають утворення піни.

Додають 1M карбонат-HCl для доведення до pH 9,5 і перемішують при кімнатній температурі протягом двох годин. Захищають від світла та уникають утворення піни.

Готують 4 мг/мл борогідрид натрію (NaBH_4) безпосередньо перед використанням і захищають від світла за допомогою алюмінієвої фольги. Негайно додають розраховану кількість NaBH_4 , необхідну для розчину MTB-LAM-AT, приготовленого раніше, та інкують реакційну суміш при приблизно 2-8°C протягом 2 год. Проводять діаліз реакційної суміші проти 1× PBS протягом мінімум 48 год. при 2-8°C з мінімум 4 замінами буфера з 8-16-годинними інтервалами. Для діалізу використовують діалізну трубку з відсіканням по молекулярній вазі 12-14 кДа.

Збереження та аналіз кон'югату:

Після діалізу центрифугують розчин кон'югату при 4000 об./хв. протягом приблизно 4 хв. Акуратно витягають супернатант і поміщають розчин кон'югату в чисту 6 мл скляну пробірку. Відміряють 18 мл стабілізатора кон'югату пероксидази/розріджувача Gardian в 50 мл скляну колбу з магнітною мішалкою. Додають 2 мл кон'югату MTB-AT-HRP і перемішують реакційну суміш протягом приблизно 10 хв. Зберігають при 2-8°C і захищають від світла.

Вищевказані стадії, що стосуються приготування кон'югату MTB, схематично представлені на Фігурі 9.

Результати

Далі ми представляємо результати дослідження безпосередньо антигену методом ELISA, який дозволяє виявляти LAM у необробленій неконцентрованій сечі за допомогою "прямого способу", що застосовується для приготування збагаченого антитіла. (Гадаємо, що ще кращий

результат буде досягнутий при застосуванні збагачених антитіл, приготовлених за допомогою «способу збагачення», описаного вище). Дослідження, що представляють дані результати, були проведені в області Мбея, що знаходиться на Південно-Західному нагір'ї Танзанії, разом з Регіональною програмою з ТБ та прокази та Медичним дослідницьким проектом Мбея (MMRP). В області Мбея щорічно діагностується приблизно 3500 нових випадків ТБ і лікування проводиться відповідно до національної стратегії DOTS. Початок кожного лікування починається в центральному відділенні Мбейського лікувально-діагностичного центра. Показник ефективності лікування ТБ становив 72,3% у 2002 р. Мета дослідження полягала у визначенні ефективності комерційно доступного аналізу ELISA з іммобілізованим LAM у клінічній практиці та порівнянні результатів із золотим стандартом діагностики ТБ: мікроскопія мокротиння, ТБ-культивування, рентгенограма легенів і клінічне дослідження.

Матеріали та методи

Опис LAM-ELISA

MTB-ELISA прямий імуноферментний сендвіч-аналіз антигену (MTB-ELISA, Chemogen, So. Portland, ME, США) є подібним до методу LAM-ELISA, розробленого іншими. Імунна сироватка була одержана з білих новозеландських кроликів, яких імунізували інактивованими цільними клітками *M. tuberculosis* лінії H37Rv. Поліклональні LAM-специфічні антитіла були виділені шляхом афінної хроматографії при використанні іммобілізованого LAM як ліганду. Тест-набір складається з 96-лункового планшета для ELISA, на якому попередньо іммобілізували LAM-специфічне антитіло, блокованого та закритого в пластиковому пакеті з осушувачем; флакон з LAM-специфічним HRP-кон'югованим LAM-специфічним поліклональним антитілом; флакона з однокомпонентною хромогенною речовиною TMB; флакона з негативним контрольним розчином, і трьох флаконів з каліброваними маркерами, що відповідають 0,5 нг/мл, 1,5 нг/мл та 4,5 нг/мл LAM у зразках сечі. Зразки сечі вважалися позитивними при аналізі ELISA, якщо одержана оптична густина при 450 нм була щонайменше на 0,1 вище сигналу негативного контролю (>2SD).

Проби сечі пацієнта об'ємом 0,1 мл поміщують у планшет для ELISA у двох повторах, інкубують протягом 1 години та відмивають 0,05% розчином Tween-20/PBS (PBST). Додають 0,1 мл LAM-специфічного HRP-кон'югату. Після 1 години інкубації планшет промивають розчином PBST і додають 0,1 мл субстрату TMB. Після 10 хвилин інкубації зупиняють реакцію субстрату додаванням 0,1 мл 1M H_2SO_4 і забарвлення реєструють при 450 нм.

В інших втіленнях, специфічну ізоформу ліпоарабіноманану (LAM), визначувану за рівнем антигенної активності, застосовують для приготування високоспецифічних поліклональних антитіл, які застосовують для виявлення ліпоарабіноманану мікобактерії в сечі пацієнтів, обстежених на наявність активної форми туберкульозу, при застосуванні протоколів, подібних до описаних вище. Антигенно-активна ізоформа LAM була виявлена при

застосуванні селективного окиснення LAM, де дві ізоформи були повністю ідентифіковані та розрізнені (дані не представлені). Одна ізоформа містила ділянки, чутливі до високих концентрацій періодату натрію ($NaIO_4$), так що при високих концентраціях періодату натрію серологічна активність LAM зводилася до нуля. Інша ізоформа зберігала серологічну активність навіть тоді, коли піддавалася впливу високих концентрацій періодату натрію. Порівняння двох способів окиснення LAM із застосуванням будь-яких м'яких окисників або низьких концентрацій $NaIO_4$ показало, що антигенна активність LAM зберігається. Окиснення високими концентраціями $NaIO_4$, однак, приводить до втрати антигенної активності LAM.

Таким чином, тільки LAM, активований CNBr, або окиснений м'якими окисниками чи низькими концентраціями $NaIO_4$, може використовуватися для створення високоантигенного LAM для застосування у приготуванні високоспецифічних, високоочищених поліклональних антитіл для застосування у виявленні LAM у зразках сечі для діагностування ТБ у обстежуваних пацієнтів.

Дані результати є цілком несподіваними при їхньому порівнянні зі способами виявлення, розкритими Svenson et al. (див., напр., WO97/34149), у яких застосовували тільки високі концентрації $NaIO_4$ для окиснення мікобактеріального LAM, і відповідно порушувалася антигенна активність LAM, використаного для створення антитіл. Не знаючи про те, що існує більш ніж одна ізоформа LAM, було неможливо раніше одержати високоспецифічні антитіла до антигенно-активної форми LAM, оскільки ніхто до даних досліджень навіть не припускав існування особливої ізоформи, що виявляє антигенну активність, або того, що така активність втрачається під час проведення стандартних способів окиснення, а саме, обробки високими концентраціями $NaIO_4$.

Опис клінічних умов

Протягом восьми тижнів 242 пацієнта з підозрами на ТБ були прийняті в амбулаторних відділеннях 5 клінічних центрів у Мбеї, Танзанія. Стандартні протоколи обстеження включали клінічну оцінку, рентгенограму легенів, ШОЕ, кількість лейкоцитів і тест на ВІЛ, 3-кратне AFB-фарбування мокротиння (Циль-Нільсен) на 1, 2 та 3 дні, культивування 2-х зразків мокротиння на середовищі Левенштейна-Йенсена та аналіз сечі та сироватки методом LAM-ELISA.

Всі пацієнти мали клінічні симптоми ТБ (кашель >4 тижнів, нічна пітливість, втрата ваги, втрата апетиту). Сто тридцять сім з них мали лабораторно підтверджену легеневу форму ТБ (ЛТБ), 9 мали сильну підозру на ЛТБ за результатами рентгенографії (плевральні випоти або збільшені прикореневі лімфатичні вузли), і у 8 виявилися клінічні та рентгенологічні ознаки «воєнного» ТБ. Пацієнти, що дали згоду, були протестовані на ВІЛ статус і 70% були підтверджені як ВІЛ-позитивні. З результатами поводитися конфіденційно. Дослідження було схвалено місцевою Інститутською наглядацькою радою та Національним комітетом з етики Республіки Танзанія.

Всі лабораторні процедури здійснювалися в лабораторному відділенні Мбейського медичного дослідницького центру.

Мікроскопія та культивування зразків мокротиння

Забарвлення за методом Циль-Нільсена та мікроскопія здійснювалися досвідченим і добре підготовленим техніком-лаборантом. Після спеціальної обробки зразки мокротиння культивували в середовищі Левенштейна-Йенсена у двох повторях. Культури перевіряли щотижня на ріст протягом 8 тижнів.

Зразки сечі

Від кожного пацієнта збирали 30 мл сечі в стерильний пластиковий контейнер, який позначали кодовим номером, що відповідає карті даних пацієнта. 100 мкл свіжої та необробленої сечі додавали в лунки планшета для ELISA у двох повторях. Негативні контролю, низько-, середньо- і високопозитивні контролю також додавали до кожного планшета у двох повторях. Зразки оброблялися протягом 24 год. і потім зберігалися при -20°C для наступного тестування в Німеччині.

Групи контролю з Танзанії та США

Зразки сечі 23 співробітників Мбейського Лікувально-діагностичного центру, 20 співробітників Chemogen, Inc. і 200 пацієнтів з 2 клінік у Нью-Йорку були протестовані методом LAM ELISA. Всі вони здавалися здоровими в процесі клінічного дослідження та не мали ніяких симптомів респіраторних інфекцій.

Результати

Доклінічна апробація способу ELISA

Фіг. 4A демонструє криву концентраційної залежності при використанні різних концентрацій LAM у сечі. Оптимальна точка відсікання визначається, відповідно до даної кривої, як концентрація LAM, що забезпечує оптичну густину (OD), яка перевищує OD негативного контролю на 0,1 OD, що відповідає більш ніж 2 стандартним відхиленням вище сигналу зразка негативного контролю. Всі зразки з оптичною густиною вище даного відсікання вважалися ELISA-позитивними. Відсікання відповідало приблизно 0,25 нг/мл LAM у необробленій свіжій сечі.

MTB-ELISA оцінювали на перехресну реактивність з іншими видами та родами грампозитивних і грамнегативних бактерій, типових для інфекцій сечової системи та бактеріальної пневмонії. Жоден з тестованих зразків не показав якої-небудь реактивності в оцінюваному способі LAM-ELISA, навіть при високих тестованих концентраціях (Фіг. 4B). Аналіз цільних клітин різних видів мікобактерій способом LAM-ELISA показує перехресну реактивність всіх тестованих видів мікобактерій (M.) (Фіг. 4C), однак M. tuberculosis H37Rv та M. bovis виявляються з більшою чутливістю. Обидва види дуже близькі з імунохімічної точки зору, тільки M. bovis рідко є причиною мікобактеріальної інфекції у людини.

Дані учасників дослідження

Відповідно до Таблиці 1, 242 досліджуваних з підозрою на ТБ були розділені на 3 основні категорії: (1) хворі легеневою формою ТБ із підтвердженим діагнозом за результатами мікроскопії та/або культивування, (2) хворі з типовими клініч-

ними та рентгенологічними ознаками і (3) хворі з клінічними симптомами ТБ, які не були передбачуваними ТБ хворими, тому що результати всіх загальнодоступних діагностичних методів (рентгенографія, мікроскопія та культивування мокротиння) були негативними.

Перша група включала 137 пацієнтів, які мали лабораторно підтверджений легеневий ТБ. У 132 було підтвердження культивуванням на середовищі Левенштейна-Йенсена і п'ятеро мали негативний результат по культивуванню та AFB-позитивний. З 132 позитивних випадків по культивуванню 62,12 % були AFB-позитивними.

Друга група включала 17 інших пацієнтів, які були включені в терапевтичну програму DOTS, на підставі рентгенографічних та клінічних даних (Таблиця 1). 88 пацієнтів третьої групи мали негативні результати мокротиння і у них не виявлялося специфічних рентгенологічних ознак легеневого ТБ, отже, вони не були включені в програму DOTS.

Середній вік учасників дослідження становив 34 роки. Співвідношення жінок до чоловіків становило 41:59. Загальний рівень поширеності ВІЛ серед 223 пацієнтів, які погодилися бути протестованими на ВІЛ, становив 69,1% (див. Таблицю 2). Рівень поширеності ВІЛ становив 73,2% серед пацієнтів з підтвердженим ТБ і 60,8% серед пацієнтів без підтвердженого ТБ.

Клінічна оцінка ELISA

З 137 пацієнтів з підтвердженим легеневим ТБ (культивування або AFB-позитивне забарвлення) 111 були LAM-ELISA позитивними (чутливість 81,02 %) за попередньо визначеним відсіканням (оптична густина (OD) негативного контролю + 0,1). Середнє перевищення OD (= середнє арифметичне OD - OD негативного контролю) для групи (82), позитивної по мікроскопії мазка та культивуванню, становило 0,604. Для негативних по мазку і позитивних по культивуванню випадків (50) середнє збільшення OD дорівнювало 0,293, і для позитивних по мазку, але негативних по культивуванню, випадків (5) - 0,249.

З 17 пацієнтів другої групи, які були негативними за результатами культивування та AFB-забарвлення, але мали рентгенологічні та клінічні ознаки ТБ, 13 (76,47%) мали позитивні результати тесту LAM-ELISA із середнім перевищенням OD 0,183. З них 13 (76,47%) були ВІЛ-позитивними.

Решта 88 пацієнтів, які потрапили в спеціалізовану ТБ клініку із клінічними симптомами, що нагадують легеневу форму ТБ, були негативними по культивуванню та AFB-фарбуванню і не мали специфічних рентгенологічних ознак ТБ. З них 13 (14,77%) мали позитивні результати LAM-ELISA тесту (середнє OD перевищення 0,184).

Ґрунтуючись на відомій концентрації в низько-, середньо- і високопозитивному контролі, що був включений у кожен планшет, можна визначити приблизну концентрацію LAM у кожній пробі сечі, ґрунтуючись на величині OD ELISA. Чи корелює концентрація LAM з індивідуальним вмістом бактерій туберкульозу, було визначено у AFB-позитивних пацієнтів. В той час, як у пацієнтів з низькою щільністю бактерій туберкульозу за даними мікроскопії (AFB+) середня концентрація антигену LAM у сечі становила 0,93 нг/мл, у пацієнтів із

середньою щільністю кислотостійких бацил (AFB++) середня концентрація антигену в сечі становила 1,74 нг/мл, і у AFB+++ пацієнтів - 2,02 нг/мл (Fig. 5). Остання величина нижче, ніж реальна концентрація LAM у сечі AFB+++ пацієнтів, оскільки прилад для зчитування ELISA, використаний у танзанійській лабораторії, не був здатним зчитувати сигнали вище двох одиниць OD, що відповідають близько 4 нг/мл.

ВІЛ-серостатус не впливав на чутливість LAM-ELISA у пацієнтів з підтвердженим легеневою ТБ. З 124 пацієнтів з відомим ВІЛ-серостатусом і позитивним ТБ за результатами культивування та/або AFB-забарвлення, 73 з 89 ВІЛ-інфікованих пацієнтів (82,0%) мали позитивний результат LAM-ELISA у порівнянні з 26 з 35 неінфікованих індивідуумів (74,3%). Подібним чином чутливість AFB не включалася у ВІЛ-серостатус. Чутливість становила 61,2% та 58,8% у ВІЛ-інфікованих і негативних індивідуумів, відповідно.

Специфічність аналізу оцінювали при використанні сечі здорових танзанійських та американських добровольців. Досліджували сечу 23 здорових танзанійських працівників госпіталю. Жоден з тестованих зразків не був позитивним по LAM-ELISA (-0,047 середня відносна OD, специфічність 100%). Зразки сечі 220 здорових добровольців зі США були зібрані та досліджені. В усіх, за винятком 4, оптична густина була нижче лінії відсікання в 0,1 OD (специфічність 98,18%).

Обговорення

Класичні способи діагностики ТБ - культивування мокротиння та мікроскопія мазків - мають очевидні обмеження. Обидва способи виявляють тільки випадки відкритої форми легеневого ТБ, що значно зменшує можливість виявлення всіх випадків активного ТБ незалежно від органного вияву. Отже, у минулому була розроблена безліч нових методів, які могли б доповнювати класичні способи, особливо, при наявних бідних технічних засобах. Критеріями, які були встановлені для таких нових методів, є а) більш висока чутливість, ніж у мікроскопії, б) порівняння специфічність, с) незначна додаткова робота, d) можливість діагностики ТБ при негативному аналізі мокротиння, та е) чутливість, що не ослабляється при наявності коінфекції ВІЛ.

У першому наближенні, чутливість LAM-ELISA (81 % позитивних по культивуванню) перевершувала AFB-забарвлення (69%). Чутливість може бути далі підвищена за рахунок концентрування свіжої сечі, що, однак, спричинить додатковий об'єм робіт для техніків-лаборантів. Імовірність виявлення способом LAM-ELISA для випадків з рентгенологічно підтвердженим «воєнним» ТБ (87,5%), так само і для випадків з негативними результатами по мокротинню з типовими рентгенологічними ознаками легеневого ТБ (67%), була обнадійливою, хоча число всіх випадків є не досить великим для остаточного висновку. Для здорових індивідуумів чутливість ELISA була високою (98,18% у США та 100% у Танзанії). Коінфекція ВІЛ у випадках ТБ за позитивними результатами культивування не впливає на чутливість LAM-ELISA.

У порівнянні з попередніми опублікованими результатами LAM-ELISA, новий тест виявляє LAM

при більш низьких концентраціях (0,2 нг/мл), ніж наявні тести. Чутливість нового тесту становила 82,9% (для AFB+) для неконцентрованої та свіжої сечі в порівнянні з чутливістю 81,3% попередніх тестів, у яких використовувалася оброблена та заморожена сеча. Специфічність тесту становила 98,36% в даному дослідженні, у порівнянні з 86,9% в попередньому дослідженні.

Обмеження такого одноразового ТБ обстеження полягало в тому, що для певної кількості пацієнтів з передбачуваним ТБ залишалися сумніви в плані їхнього ТБ-статусу (група 2 та 3). Для вирішення цього питання ми виділили три основні категорії для аналізу: Група 1: лабораторно підтверджений ТБ, Група 2: клінічно та рентгенологічно визначений ТБ, Група 3: немає лабораторних або рентгенологічних доказів ТБ. Хоча ми були впевнені, що у учасників з категорії 1 є справжній ТБ, ми не могли виключити, що категорії 2 та 3 включають ряд пацієнтів, неправильно розподілених по групах. У зв'язку із цим ми виключили їх з нашого розрахунку чутливості та специфічності. При діагнозі ТБ часто потрібно тривале лікарське спостереження за пацієнтами. Особливо, пацієнти з негативними результатами мокротиння, але з незвичайними рентгенологічними ознаками, будуть мати потребу в декількох додаткових консультаціях для того, щоб удруге досліджувати їхній ТБ-статус. При тривалому дослідженні повторні клінічні, так само як і діагностичні, огляди та результати лікування ТБ можуть дати важливу додаткову інформацію для класифікації Груп 2 та 3 на хворих ТБ і не хворих ТБ пацієнтів.

Винятковий інтерес представляє питання, чи існує кількісна кореляція між бактеріальним обсіменінням *M. tuberculosis* та кількістю LAM, виявленим у сечі. Єдиний спосіб для відповіді на це питання при комплексному дослідженні полягав у встановленні кореляції величини AFB-забарвлення мокротиння та концентрації LAM у сечі. Як показано на Фігурі 5, існувала очевидна позитивна кореляція концентрації антигену в сечі та щільності туберкульозних бактерій у мокротинні. Така кореляція розкриває деякі додаткові можливості застосування LAM-аналізу. Контроль за успішним лікуванням і раннє розпізнавання загострень після завершення лікування представляють пряму практичну значимість. Сполучення зі здатністю виявляти позалегенову форму ТБ і ТБ при AFB-негативних результатах дозволяє вважати LAM-аналіз потужним інструментом в умовах зростаючого поширення позалегенових форм ТБ і легеневої форми із нетиповими клінічними симптомами. LAM-ELISA може бути застосований не тільки для діагностування пацієнтів із клінічними симптомами, але також для обстеження ВІЛ-позитивних пацієнтів та інших груп з високим ступенем ризику. Виявлення ТБ на початковій стадії захворювання та ефективне лікування є двома опорами в успішній боротьбі проти ТБ. Для подальшого вивчення ролі LAM-аналізу в даній боротьбі ми в цей час запланували деякі перспективні та многоцентрові дослідження.

Таким чином, LAM-ELISA може бути з легкістю включений до рутинних діагностичних процедур лабораторій як розвинених країн, так і країн, що

розвиваються. Це легкий у використанні та надійний метод. Виконання аналізу ELISA вимагає всього 2,5 год., і велика кількість зразків може бути проаналізована одночасно. Оскільки антиген ліпоарабіноманан є стабільним, можна було зберігати сечу в холодильнику протягом 3 днів без значного

зменшення оптичної густини. Знову розроблений MTB-ELISA для виявлення LAM у необробленій сечі має потенціал скринінг-тесту для застосування також в польових умовах у країнах, що розвиваються.

Таблиця 1

Аналіз екскреції LAM у сечі серед 242 пацієнтів, що надійшли в амбулаторне відділення із клінічними підозрами на ТБ, і контрольної групи з 243 клінічно здорових людей. Границею відсікання для позитивності по LAM-ELISA є 0,1 вище середньої оптичної густини негативного контролю на планшеті

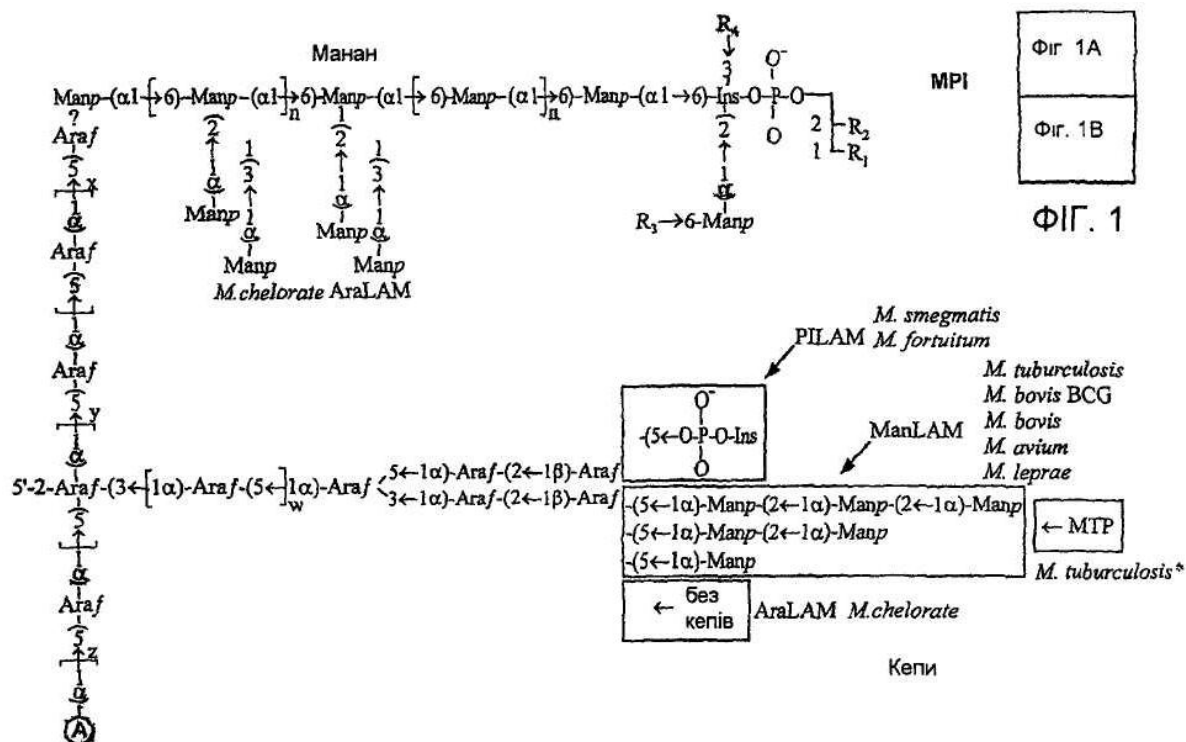
Група спостереження	ТБ Діагноз	Учасники	LAM +	LAM -
1:	LJ+ та/або AFB	137	111 (81,02%)	26
Лабораторно підтверджений ТБ				
	LJ+ та AFB+	82	68 (82,9%)	14 (17,1%)
	Тільки LJ+	50	38 (76%)	12 (24%)
	Тільки AFB+	5	5 (100%)	0 (0%)
2:	Воєнний ТБ	8	7	1
Клінічно та рентгенологічно діагностований ТБ			(87,5%)	(12,5%)
	Плевральний випот або збільшені прикореневі лімф. вузли	9	6	3
			(67%)	(33%)
3:				
Лабораторно або рентгенологічно не підтверджений ТБ	Тільки клінічні ознаки ТБ	88	13	75
	Не зареєстровані в DOTS		(14,77%)	(85,23%)
4:	Немає клінічних ознак ТБ	243	4	
Негативна контрольна група			(1,64%)	

+ = позитивний.

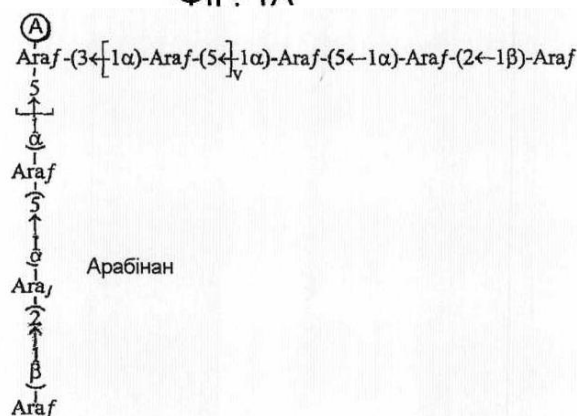
Таблиця 2

Співвідношення ВІЛ-позитивних пацієнтів у різних групах. 223 з 242 дали згоду на ВІЛ-тестування

	ВІЛ +
Всі підозрілі на ТБ	69,1%
Культивування + (119)	71,1%
AFB+ (77)	72,7%
EXPTB (17)	76,47%



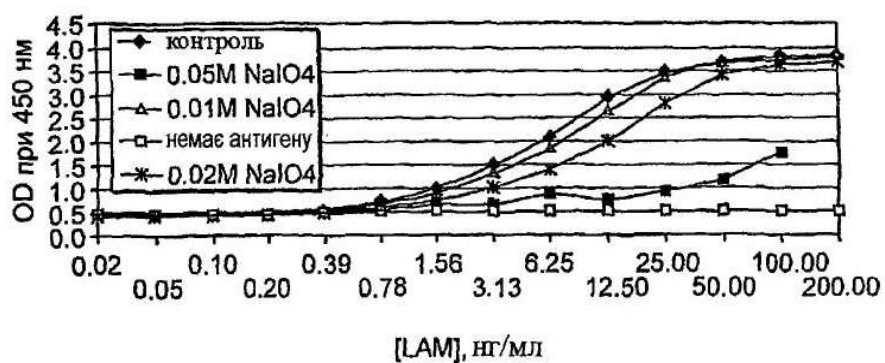
Фиг. 1A



Фиг. 1B

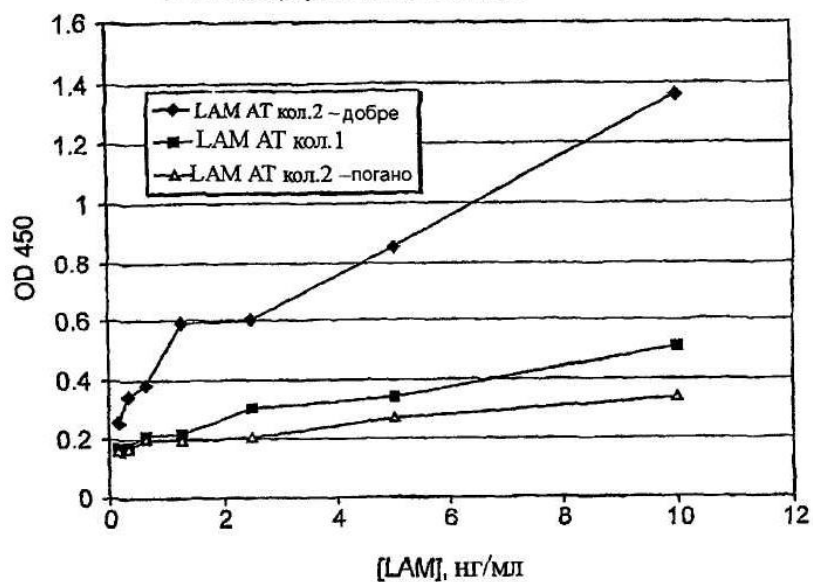
Структурная модель мікобактеріальних ManLAM, PILAM та AraLAM. MTP відповідає 5-метиліопентозі, описаній дотепер (*) в штаммах *M. tuberculosis* H37Rx, H37Ra, CSU20[63] та MT K3[64]. 5' відповідає сукцинільним залишкам, розташованим на арабінановому домені ManLAM *M. bovis* BCG. Було показано, що від однієї до чотирьох сукцинільних груп, в залежності від штаму *M. bovis* BCG, етерифікують 3,5- α -Araf одиниці в положенні 0-2 [65]. MPI, манозил-фосфатидил-міо-інозитол; Manp, манопіраноза, Araf, арабінофураноза; Ins, міо-інозитол; Rn, жирні ацильні групи. ManLAM містить приблизно 60 Araf та 50 Manp одиниць. Manp одиниці розподілені поміж манозних кепів (Таблиця 2) і мананового кора (30-35) [66].

Порівняння серологічної активності для експериментів з окиснення LAM - (екстрагований фенолом та діалізований LAM)

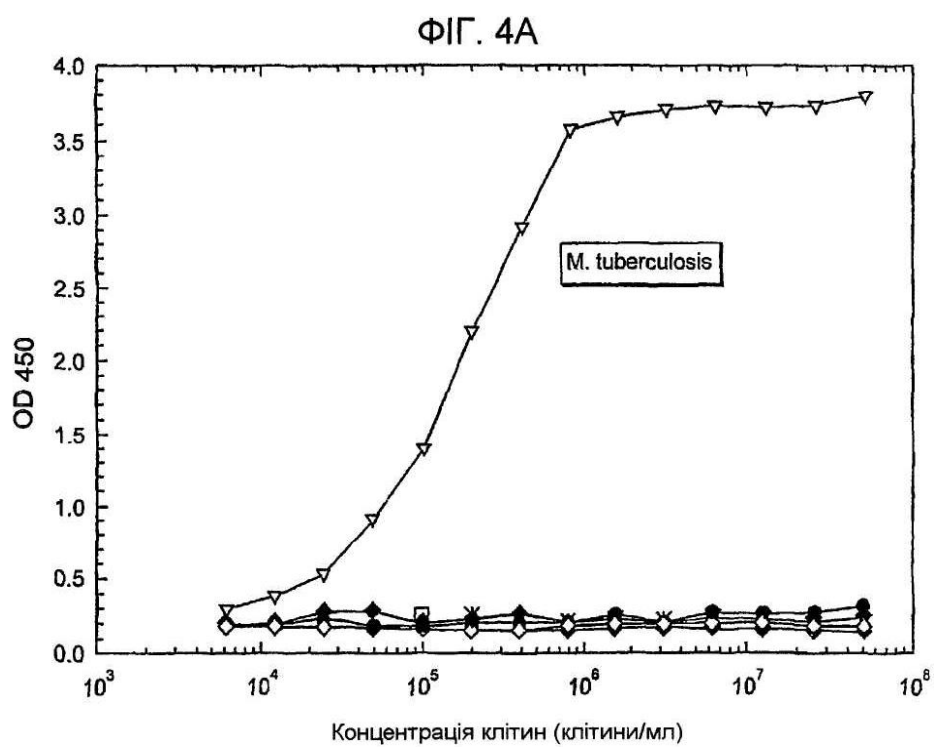
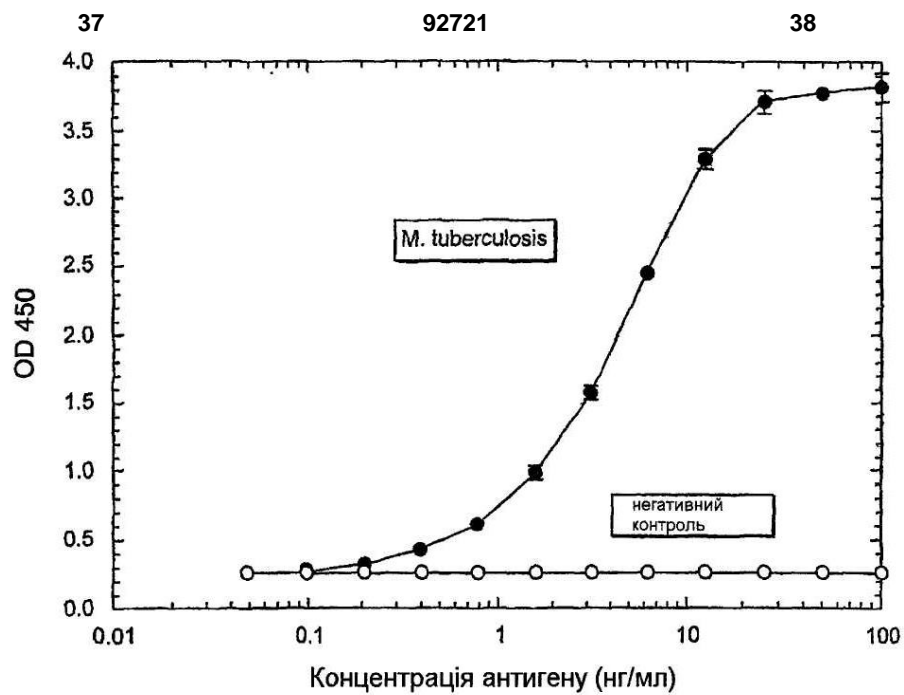


ФІГ. 2

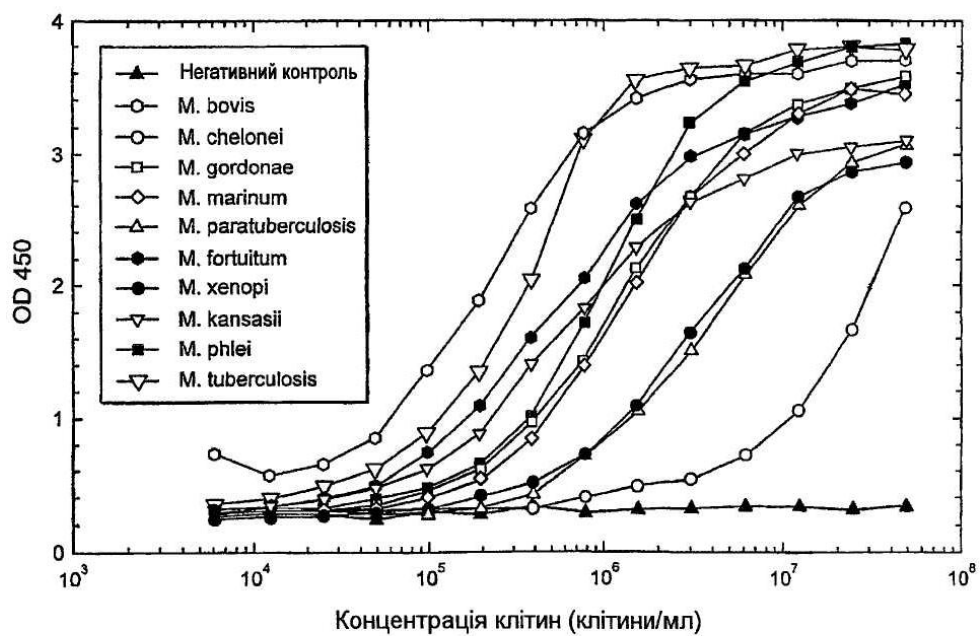
Ефективність зв'язування приготовлених LAM-специфічних АТ в ELISA



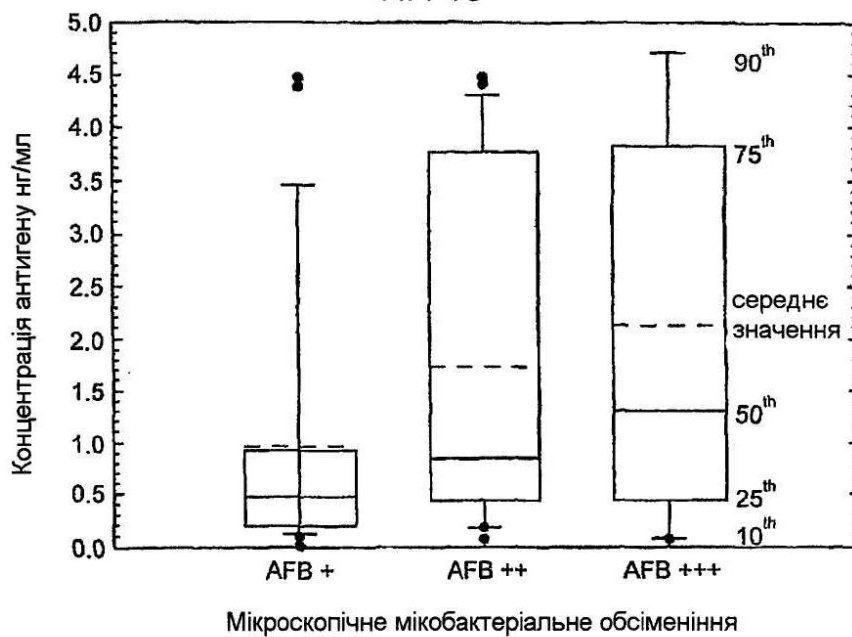
ФІГ. 3



ФІГ. 4В

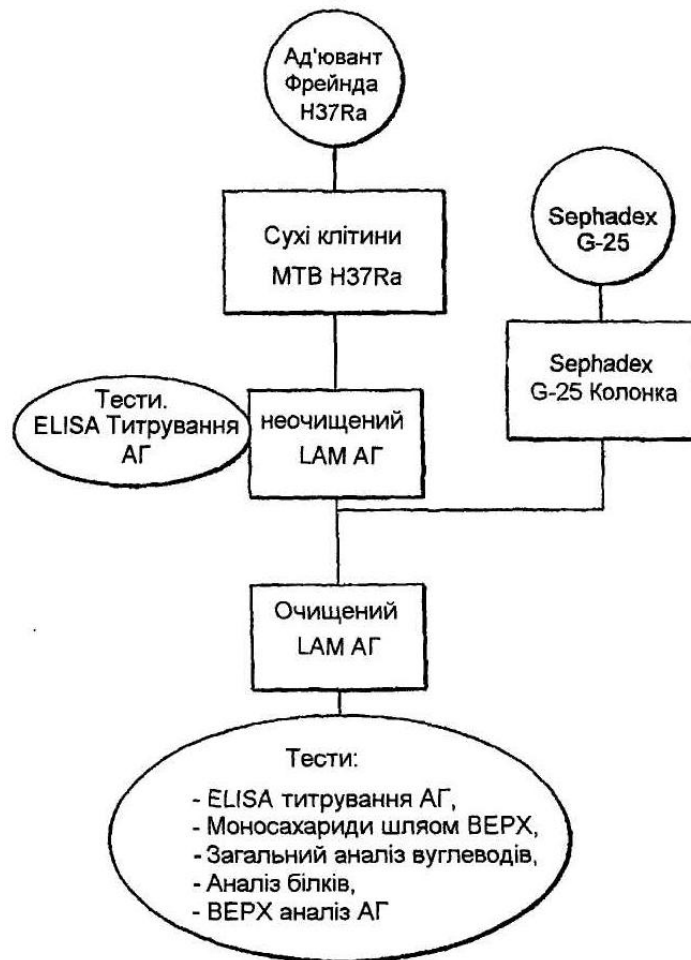


ФІГ. 4С

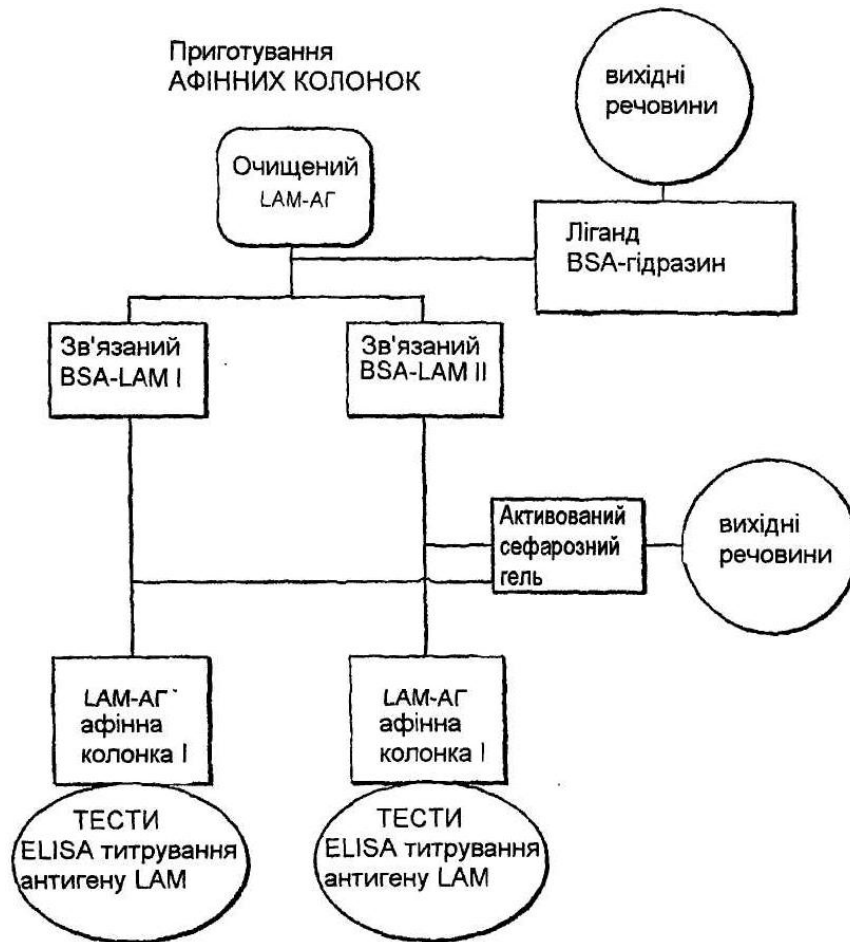


ФІГ. 5

Спосіб очищення
антигену



ФІГ. 6

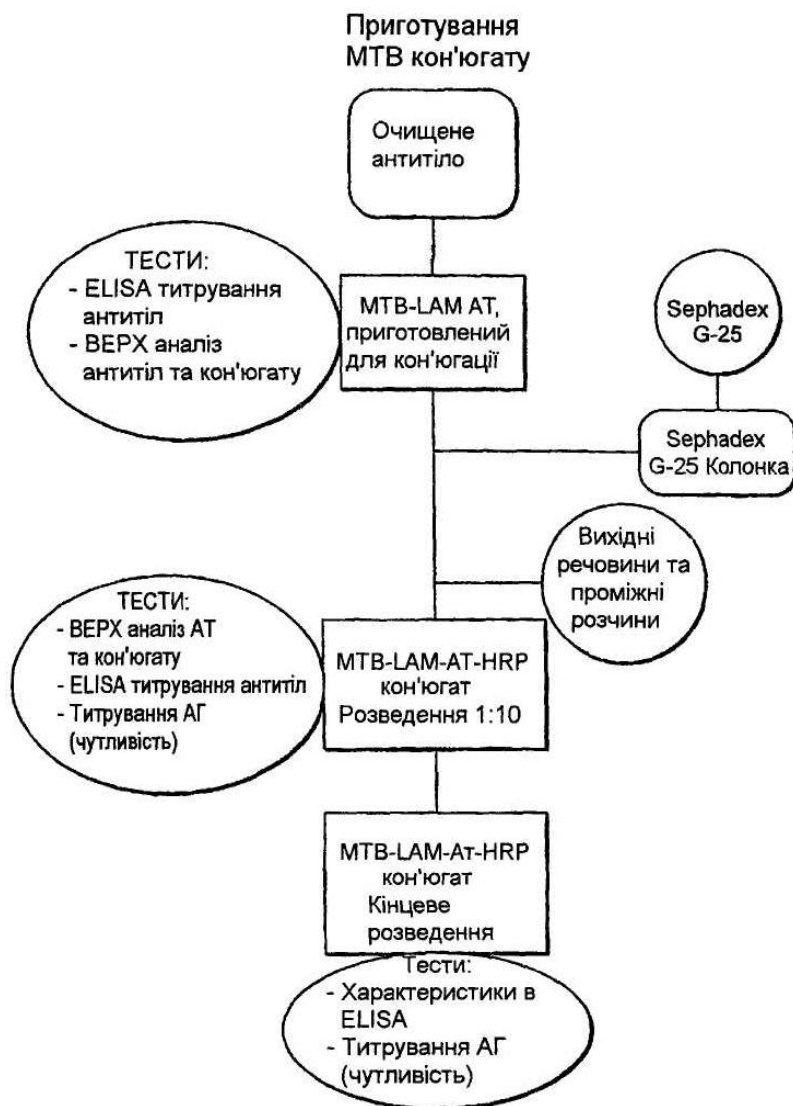


ФІГ. 7

Очищення
антитіл до МТВ



ФІГ. 8



ФІГ. 9